

**POTENSI VAKSIN LECTIN-LIKE OXIDIZED LDL RECEPTOR-1 (LOX-1) DALAM MENCEGAH ATEROSKLEROSIS:
STUDI EFEK VAKSIN DNA LOX-1 DALAM MENCEGAH PEMBENTUKAN SEL BUSA PADA AORTA TIKUS WISTAR DAN VAKSIN SUBUNIT LOX-1 DALAM MENCEGAH DEPOSISI LIPID PADA ABDOMINAL MESENTERIC ARTERY SHR-SP**

DISERTASI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor**



Oleh

**VALENTINA YURINA
147070100111009**

**PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
MINAT BIOMEDIK**

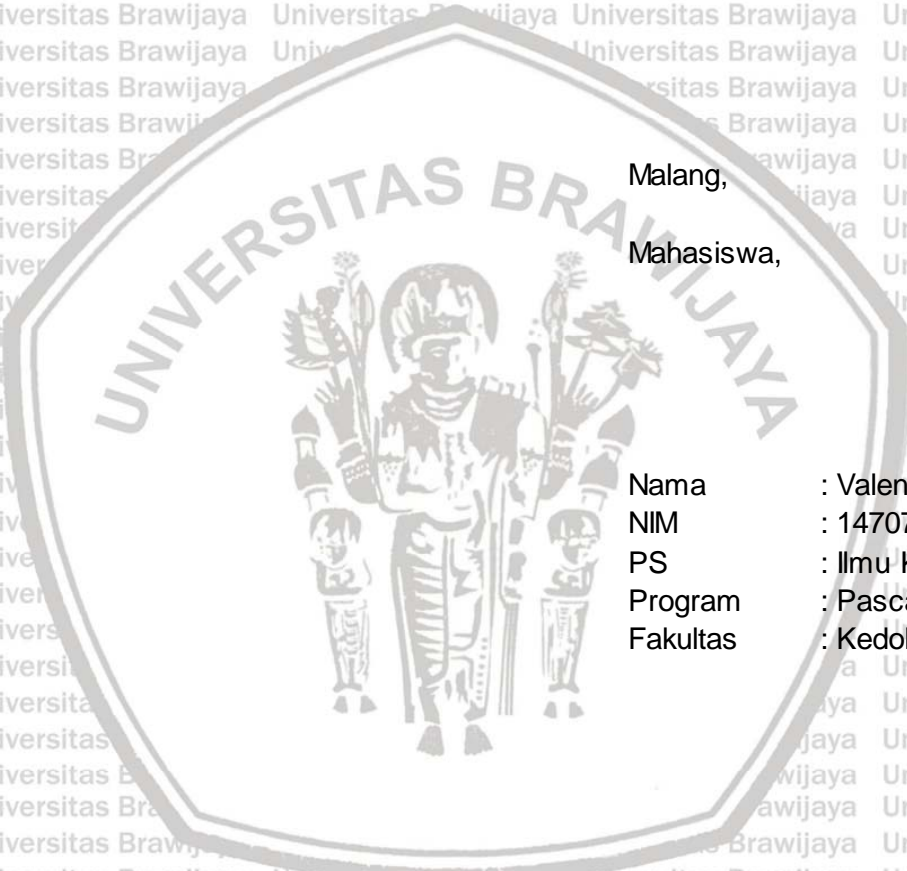
**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundangundangan yang berlaku.



Malang,
Mahasiswa,

Nama : Valentina Yurina
 NIM : 147070100111009
 PS : Ilmu Kedokteran
 Program : Pascasarjana
 Fakultas : Kedokteran UB



JUDUL DISERTASI:

POTENSI VAKSIN LECTIN-LIKE OXIDIZED LDL RECEPTOR-1 (LOX-1) DALAM MENCEGAH ATEROSKLEROSIS: STUDI EFEK VAKSIN DNA LOX-1 DALAM MENCEGAH PEMBENTUKAN SEL BUSA PADA AORTA TIKUS WISTAR DAN VAKSIN SUBUNIT LOX-1 DALAM MENCEGAH DEPOSISI LIPID PADA ABDOMINAL MESENTERIC ARTERY SHR-SP

Nama Mahasiswa : Valentina Yurina

NIM : 147070100111009

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Minat : Biomedik

KOMISI PROMOTOR:

Promotor : Prof. Dr.dr. Kusworini Handono, M.Kes, Sp.PK.

Ko-promotor 1 : Prof. Dr.dr. Achmad Rudijanto, Sp.PD. KEMD –FINASIM

Ko-Promotor 2 : Dr. rer. nat. Tri Yudani Mardining Raras, M.App.Sc.

TIM DOSEN PENGUJI:

Dosen Penguji 1 : Dra. Diana Lyrawati, Apt. M.Kes., Ph.D.

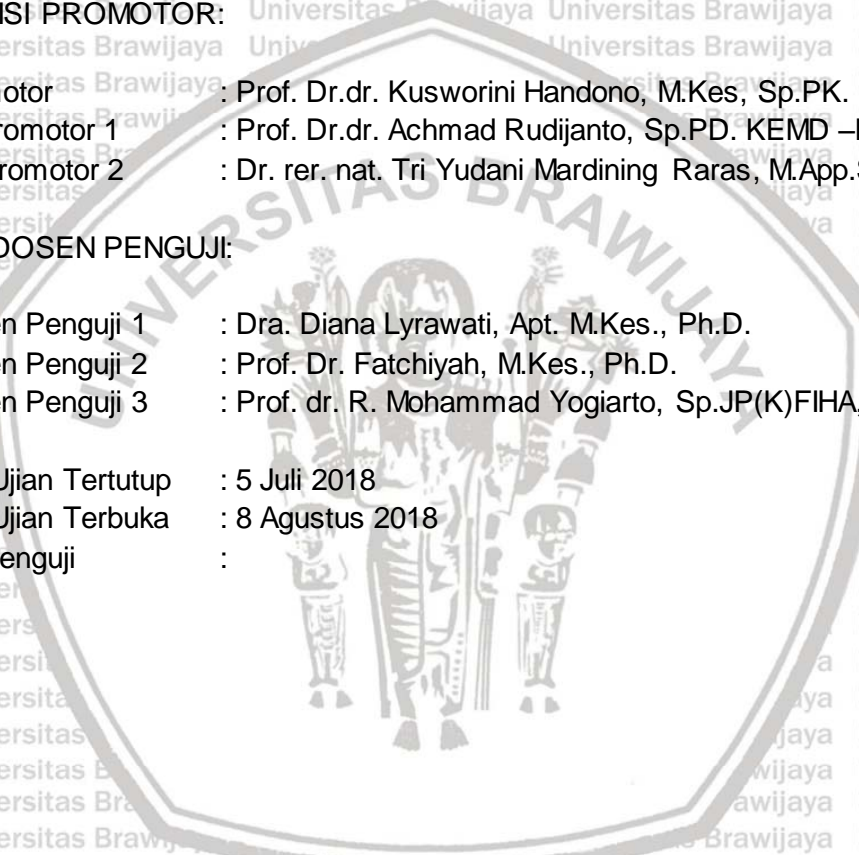
Dosen Penguji 2 : Prof. Dr. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D.

Dosen Penguji 3 : Prof. dr. R. Mohammad Yogiarto, Sp.JP(K)FIHA, FASCC.

Tgl. Ujian Tertutup : 5 Juli 2018

Tgl. Ujian Terbuka : 8 Agustus 2018

SK Penguji :



RINGKASAN

Yurina, Valentina, NIM.147070100111009. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Potensi Vaksin *Lectin-Like Oxidized LDL Receptor-1* (Lox-1) dalam Mencegah Aterosklerosis: Studi Efek Vaksin DNA LOX-1 Dalam Mencegah Pembentukan Sel Busa pada Aorta Tikus Wistar Dan Vaksin Subunit LOX-1 Dalam Mencegah Deposisi Lipid pada *Abdominal Mesenteric Artery* SHR-SP. Komisi Pembimbing: Ketua: Kusworini Handono, Anggota: Achmad Rudijanto, Tri Yudani Mardining Raras.

Aterosklerosis adalah proses peradangan kronis yang dapat mengarah pada terjadinya berbagai komplikasi seperti misalnya penyakit kardiovaskular. Hingga saat ini penyakit kardiovaskular masih menjadi penyebab utama kematian di dunia dan prevalensinya semakin meningkat di negara berkembang seiring dengan perubahan gaya hidup.

Aterosklerosis diawali dengan ambilan LDL teroksidasi (*ox-LDL*) ke dalam sel endotel yang diperantarai oleh reseptornya. *Lectin like oxidized-LDL receptor-1* (LOX-1) merupakan reseptor utama *ox-LDL* berupa protein *homodimer* yang diekspresikan berlebih akibat berbagai stimulus, misalnya *ox-LDL* dan stres oksidatif. Ikatan antara *ox-LDL* dan LOX-1 akan memicu jalur pensinyalan dalam sel yang berakibat pada aktivasi dan disfungsi sel endotel, yang teridentifikasi melalui peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) intraselular, penurunan *Nitric Oxide* (NO), dan aktivasi faktor transkripsi *nuclear faktor kappa beta* (NF- κ B). Selanjutnya, aktivasi NF- κ B diikuti dengan peningkatan ekspresi sitokin, molekul *adhesin*, dan protease. Melihat sentralnya peran LOX-1 dalam aterosklerosis, penghambatan LOX-1 menjadi salah satu strategi terapi aterosklerosis baru yang potensial.

Vaksinasi merupakan salah satu terapi pencegahan aterosklerosis yang mulai dikembangkan. Penelitian pengembangan vaksin LOX-1 dibagi dalam dua tahap, yaitu penelitian tahap I berupa pengembangan vaksin DNA rekombinan dengan menggunakan region penyandi C-type like domain (CTLD)-LOX-1 yang dibawa plasmid pcDNA3.1. Vaksin DNA ini diberikan dengan menggunakan adjuvan alum melalui rute injeksi intramuskuler. Penelitian tahap II merupakan pengembangan vaksin protein subunit yang diproduksi menggunakan teknologi DNA rekombinan yaitu dengan memproduksi antigen CTLD-LOX-1 pada sel inang *Lactococcus lactis* NZ9000. Selain sebagai produsen protein sub-unit CTLD LOX-1, *L.lactis* juga dimanfaatkan sebagai bakteri pembawa vaksin yang diberikan melalui rute oral.

Pada penelitian tahap I, untuk mengembangkan vaksin DNA LOX-1 dilakukan *construct* dengan menyisipkan gen penyandi CTLD LOX-1 tikus pada plasmid pembawa (pcDNA3.1). LOX-1 diuji ekspresinya secara *in vitro* pada sel mamalia (sel HeLa). CTLD-LOX-1 disintetik secara kimia dan digabungkan dengan gen penyandi *green fluorescence protein* (GFP) dengan menggunakan pcDNA3.1 sebagai plasmid pembawa. Plasmid pcDNA3.1-LOX-1 dan pcDNA3.1-GFP-LOX-1 ditransfeksikan ke dalam sel HeLa dengan metode lipotransfeksi. Analisa ekspresi mRNA LOX-1 dan GFP-LOX-1 lebih tinggi pada sel HeLa yang ditransfeksi dengan pLOX-1 (~ 300x) dan pGFP-LOX-1 (~ 275.000 kali) daripada sel HeLa yang tidak ditransfeksi. Ekspresi protein LOX-1 pada sel HeLa yang ditransfeksi dengan pLOX-1 terdeteksi pada ukuran 14 kDa yang menunjukkan ukuran CTLD-LOX-1. Hal ini menunjukkan bahwa plasmid pcDNA3.1-LOX-1 dikenali oleh sistem mamalia dan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin pada hewan coba. Selanjutnya vaksin LOX-1 diuji efektivitasnya dalam mencegah aterosklerosis dengan menggunakan alum sebagai adjuvan melalui rute intramuskuler.

Adjuvan berupa alum yang digunakan berperan sebagai sistem depot yang meningkatkan waktu retensi vaksin pada lokasi pemberian sehingga memicu akumulasi *antigen presenting cells* (APC). Dalam penelitian ini terlihat bahwa vaksin DNA-LOX-1

mampu mencegah kerusakan struktur intima media aorta pada tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang ditunjukkan dengan struktur sel otot polos yang normal dan minimnya jumlah infiltrasi mononuclear dan sel busa. Vaksin DNA LOX-1 juga sedikit mencegah peningkatan ekspresi LOX-1 ($p = 0,371$) pada sel endotel jaringan aorta tikus yang dianalisa dengan teknik *immunofluorescence*. Analisa imunohistokimia menunjukkan bahwa vaksin DNA LOX-1 tampak mencegah penurunan ekspresi eNOS ($p = 0,419$) pada sel endotel jaringan aorta tikus. Lebih lanjut vaksin DNA LOX-1 juga diduga mencegah pembentukan sel busa ($p = 0,096$) pada jaringan aorta tikus. Penelitian pendukung juga menunjukkan bahwa vaksin LOX-1 mampu mencegah inflamasi pada aorta tikus melalui pencegahan ekspresi NF- κ B, TNF- α , dan IL-6. Vaksin LOX-1 tidak menginduksi peningkatan produksi antibodi anti-LOX-1 sehingga diduga vaksin LOX-1 bekerja melalui sistem imun selular.

Pada penelitian tahap II, vaksin subunit LOX-1 dibawa oleh *L. lactis* rekombinan sebagai pembawa. LOX-1 diekspresikan secara *in vitro* di dalam sel *L. lactis* rekombinan sebagai protein fusi dengan GFP. Analisa Western Blot menunjukkan LOX-1 diproduksi melalui induksi nisin. *L. lactis* yang mengekspresikan LOX-1 diberikan pada hewan coba *spontaneous hypertensive rats-stroke prone* (SHR-SP) melalui rute oral. Level antibodi IgG anti-LOX-1 lebih tinggi secara signifikan pada tikus yang divaksinasi dibandingkan dengan tikus kontrol ($p = 0,046$). Anti LOX-1 mencegah pengikatan ox-LDL dengan LOX-1 sehingga mencegah disfungsi endotel. Vaksin subunit LOX-1 mampu meningkatkan respon imun humoral melalui induksi produksi antibodi IgG anti-LOX-1. Walaupun demikian, titer antibodi tidak cukup tinggi untuk dapat memblokir LOX-1 secara keseluruhan sehingga area disposisi lipid pada tikus yang divaksin tidak turun secara signifikan ($p = 0,232$).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah LOX-1 merupakan protein yang potensial untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin anti aterosklerosis, baik melalui pendekatan vaksin DNA maupun vaksin subunit. Walaupun demikian perlu dilakukan optimasi dosis, rute pemberian, dan formulasi adjuvan untuk meningkatkan respon imun sehingga dapat mencegah kerusakan struktur sel endotel pada jaringan aorta dan pembentukan plak aterosklerosis.

SUMMARY

Yurina, Valentina, NIM.147070100111009. Postgraduate Program, Medical Faculty, Universitas Brawijaya, Malang. Lectin-Like Oxidized-LDL Receptor-1 (LOX-1) Vaccine Potency in Preventing Atherosclerosis: Study of DNA LOX-1 Vaccine in Inhibiting Foam Cells Formation in Aorta of Wistar Rats and Subunit LOX-1 Vaccine in Inhibiting Lipid Deposition in Abdominal Mesenteric Artery of SHR-SP. Supervisors: Head: Kusworini Handono, Members: Achmad Rudijanto, Tri Yudani Mardining Raras.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory condition that leads to various fatal complications such as cardiovascular diseases. At present, cardiovascular diseases are still the leading cause of mortality in the world and its prevalence is increasing in developing countries along with lifestyle changes.

Atherosclerosis is initiated with oxidized LDL (ox-LDL) uptake into endothelial cells mediated by their receptors. Lectin-like oxidized-LDL receptor-1 (LOX-1) is the main receptor of ox-LDL which expression is induced by various stimuli, such as ox-LDL and oxidative stress. The binding between ox-LDL and LOX-1 triggers cell signaling pathways that result in endothelial cell activation and dysfunction, identified through increased intracellular reactive oxygen species (ROS) production, decreased Nitric Oxide (NO), and activation of nuclear factor kappa beta (NF- κ B) transcription factor. Furthermore, activation of NF- κ B is followed by increased expression of cytokines, adhesion molecules, and proteases. Given the central role of LOX-1 in atherosclerosis, LOX-1 inhibition becomes one of the potential new atherosclerosis therapeutic candidates.

Prevention of atherosclerosis using vaccination is a promising approach. The study was divided into two steps, the first study was to develop DNA recombinant vaccine with C-type lectin-like domain (CTLD) LOX-1 combined with the pcDNA3.1 plasmid. The DNA vaccine was given intramuscularly using alum as the adjuvant. The second study was a subunit vaccine development. The subunit vaccine was developed using *Lactococcus lactis* NZ9000 as the host cell to produce CTLD-LOX-1 protein. *L. lactis* was also used as the carrier to bring the vaccine through the oral route.

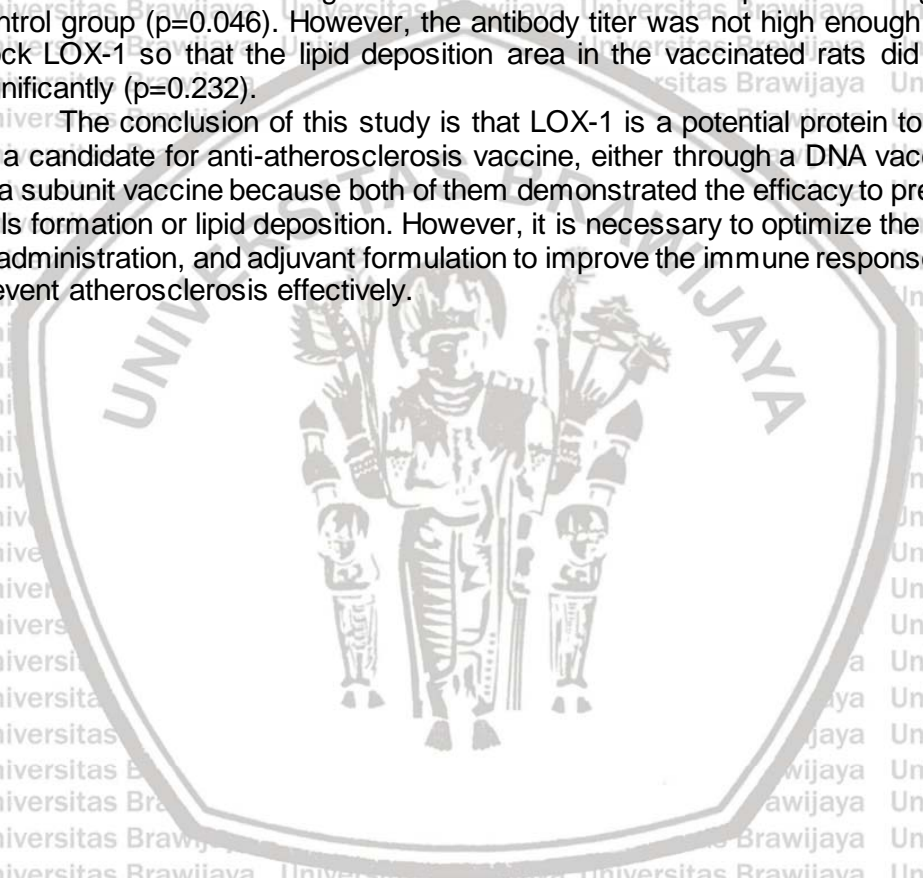
The LOX-1 vaccine is a promising atherosclerosis vaccine candidate. In the first step of the study, the LOX-1 DNA vaccine was constructed by inserting a C-type like-domain (CTLD) LOX-1 rat gene on a carrier plasmid. The in vitro expression was assayed on mammalian cells (HeLa cells). CTLD-LOX-1 was synthesized chemically and combined with the gene encoding green fluorescence protein (GFP) using pcDNA3.1. Plasmid pcDNA3.1-LOX-1 and pcDNA3.1-GFP-LOX-1 were transfected into HeLa cells using lipotransfection method. Measurement of LOX-1 and GFP-LOX-1 mRNA expression using qRT-PCR demonstrated that the mRNA expression was higher in HeLa cells transfected with pLOX-1 (\approx 300x) and pGFP-LOX-1 (\approx 275,000 times) than mRNA expression in non-transfected HeLa cells. The expression of the LOX-1 protein in pLOX-1 transfected HeLa cells was detected at 14kDa size, indicating the correct CTLD-LOX-1 size. This result suggests that the pcDNA3.1LOX-1 plasmid is recognized by the mammalian expression system and can be used as a vaccine candidate in experimental animals.

The LOX-1 DNA vaccine was assayed for its effectiveness in preventing atherosclerosis using alum as adjuvant given by intramuscular route. Alum adjuvant acts as a depot system that increases vaccine retention time at the administrative sites to trigger the accumulation of antigen presenting cells (APC). In this study, the LOX-1 DNA vaccine demonstrated to inhibit the structural damage of the aortic intima-media in Wistar rats fed with a high-fat diet, demonstrated by the normal smooth muscle-cells structure and the minimal amount of mononuclear infiltration. The LOX-1 DNA vaccine also slightly prevented the expression of LOX-1 ($p=0.317$) in the endothelial cells. Immunohistochemistry staining revealed that the LOX-1 DNA vaccine slightly inhibited

the eNOS reduction in the endothelial cells ($p = 0.419$). LOX-1 DNA vaccine slightly inhibited the foam cells formation ($p=0.096$). Studies also show that LOX-1 DNA vaccine was able to prevent inflammation in rat aorta through the prevention of NF- κ B, TNF- α , and IL-6 expression. The LOX-1 vaccine did not induce the anti-LOX-1 antibody production, thus it is expected that the LOX-1 vaccine works through the cellular immune system.

In the second step of the study, the subunit LOX-1 vaccine was carried by recombinant *L. lactis* as a delivery vector. LOX-1 is expressed in recombinant *L. lactis* cells. Western Blot analysis showed that LOX-1 was overexpressed through nisin induction. *L. lactis* expressing LOX-1 was administered to spontaneous hypertensive rats-stroke prone (SHR-SP) via the oral route. Anti LOX-1 prevents the binding of ox-LDL with LOX-1 thus preventing endothelial dysfunction. The subunit LOX-1 vaccine is capable of enhancing humoral immune response through induction of IgG anti-LOX-1 production. IgG anti-LOX-1 level was higher in the vaccinated rats compared to the IgG level in the control group ($p=0.046$). However, the antibody titer was not high enough to completely block LOX-1 so that the lipid deposition area in the vaccinated rats did not decrease significantly ($p=0.232$).

The conclusion of this study is that LOX-1 is a potential protein to be developed as a candidate for anti-atherosclerosis vaccine, either through a DNA vaccine approach or a subunit vaccine because both of them demonstrated the efficacy to prevent the foam cells formation or lipid deposition. However, it is necessary to optimize the dosage, route of administration, and adjuvant formulation to improve the immune response so that it can prevent atherosclerosis effectively.



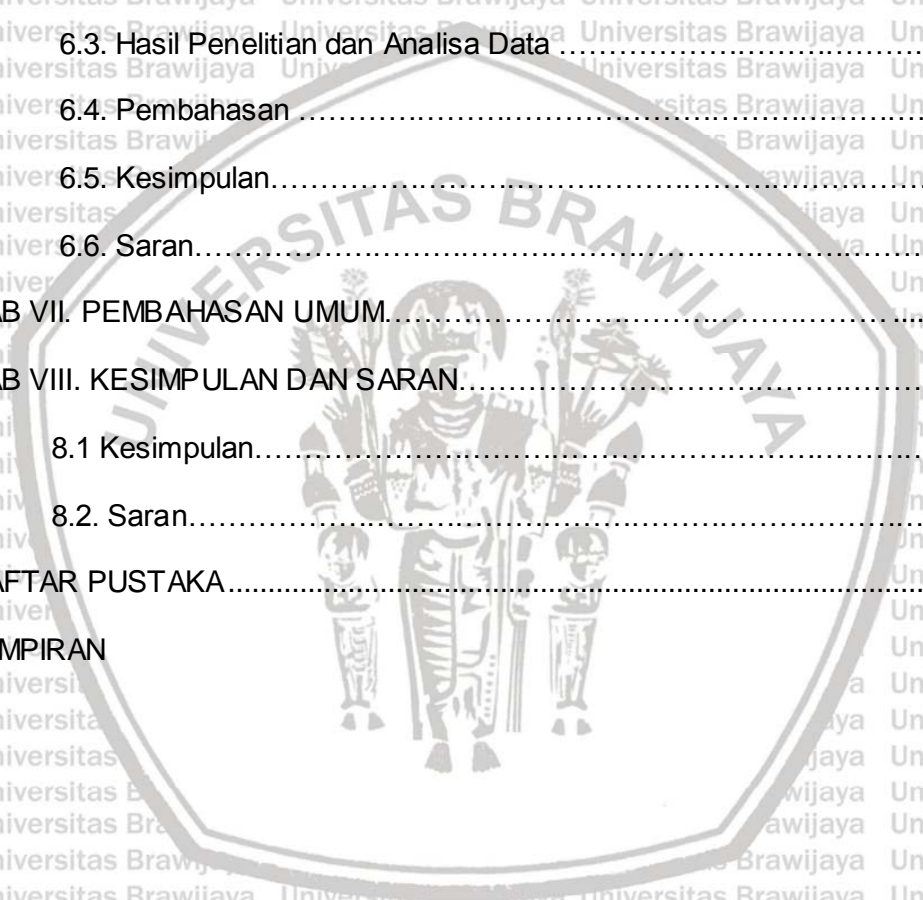
DAFTAR ISI	Halaman
RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan masalah	5
1.3 Tujuan penelitian	6
1.4 Manfaat penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Aterosklerosis	8
2.1.1. Prevalensi aterosklerosis	8
2.1.2. Patofisiologi aterosklerosis	9
2.2 LOX-1	12
2.2.1. Struktur LOX-1	12
2.2.2. Peran LOX-1 dalam aterosklerosis	17
2.2.2.1 Peran LOX-1 dalam disfungsi dan aktivasi sel endotel	17
2.2.2.2. Peran LOX-1 dalam adhesi dan rekrutmen monosit	19
2.2.2.3. Peran LOX-1 dalam apoptosis sel endotel dan SMC	20
2.2.2.4. Peran LOX-1 dalam aktivasi platelet dan instabilisasi plak	21

2.3 Vaksin DNA.....	23
2.3.1. Komponen Utama Penyusun Vaksin DNA Penurunan.....	23
2.3.2. Mekanisme aksi vaksin DNA.....	24
2.3.2.1. Mekanisme aksi vaksin DNA dalam memicu presentasi Antigen.....	24
2.3.2.2. Mekanisme DNA <i>sensing</i> intraselular.....	26
2.3.2.3. Mekanisme aksi vaksin DNA dalam memicu sistem imun selular.....	28
2.3.2.4. Mekanisme aksi vaksin DNA dalam memicu sistem imun humoral.....	30
2.4. Vaksin Subunit Oral.....	32
2.4.1. Definisi Vaksin Subunit Oral.....	32
2.4.2. Bakteri sebagai pembawa vaksin subunit rekombinan oral.....	33
2.4.3. Mekanisme vaksin subunit rekombinan oral dengan pembawa bakteri dalam memicu sistem imun.....	34
BAB 3 KERANGKA KONSEP.....	36
3.1 Kerangka Pikir.....	36
3.1 Kerangka konsep.....	40
3.2 Hipotesis penelitian.....	42
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	44
4.1 Metode Penelitian Secara Umum.....	44
4.1.1. Penelitian Tahap I.....	45
4.1.2. Penelitian Tahap II.....	45
4.2 Diagram Alur Penelitian.....	46
4.2.1. Alur Penelitian Tahap I.....	46
4.2.2. Alur Penelitian Tahap II.....	48

BAB 5. PENELITIAN TAHAP I: ANALISA POTENSI VAKSIN DNA LOX-1	
DALAM MENCEGAH DISFUNGSI ENDOTEL DAN PEMBENTUKAN SEL	
BUSA PADA JARINGAN AORTA TIKUS WISTAR DENGAN DIET TINGGI	
LEMAK	50
5.1. Pendahuluan.....	50
5.1.1. Perumusan Masalah.....	50
5.1.2. Tujuan Penelitian.....	50
5.2. Metode Penelitian.....	51
5.2.1. Desain Penelitian.....	51
5.2.2. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	51
5.2.3. Sampel.....	52
5.2.4. Variabel Penelitian.....	55
5.2.5. Bahan dan Alat Penelitian.....	55
5.2.6. Definisi Operasional.....	59
5.2.7. Prosedur Penelitian Tahap I.....	61
5.3. Hasil Penelitian dan Pengolahan Data.....	75
5.4. Pembahasan.....	89
5.5. Kesimpulan.....	98
5.6. Saran.....	99

BAB 6. PENELITIAN TAHAP II: ANALISA POTENSI VAKSIN	
REKOMBINAN LOX-1 DALAM MENCEGAH DEPOSISI LIPID PADA	
ABDOMINAL MESENTRIC ARTERY TIKUS SHR-SP DENGAN DIET	
TINGGI LEMAK	100
6.1. Pendahuluan.....	100
6.1.1. Perumusan Masalah.....	100
6.1.2. Tujuan Penelitian.....	100
6.2. Metode Penelitian.....	101

6.2.1. Desain Penelitian.....	101
6.2.2. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	101
6.2.3. Sampel.....	102
6.2.4. Variabel Penelitian.....	104
6.2.5. Bahan dan Alat Penelitian.....	104
6.2.6. Definisi Operasional.....	106
6.2.7. Prosedur Penelitian Tahap II.....	106
6.3. Hasil Penelitian dan Analisa Data.....	119
6.4. Pembahasan.....	134
6.5. Kesimpulan.....	142
6.6. Saran.....	142
BAB VII. PEMBAHASAN UMUM.....	143
BAB VIII. KESIMPULAN DAN SARAN.....	150
8.1 Kesimpulan.....	150
8.2. Saran.....	150
DAFTAR PUSTAKA.....	151
LAMPIRAN	



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tahap perkembangan plak atherosclerosis	11
Gambar 2.2	Domain Penyusun Protein LOX-1.....	12
Gambar 2.3	Skema gen OLR 1.....	13
Gambar 2.4	Pengikatan 37 α heliks residu ox-LDL dengan LOX-1.....	15
Gambar 2.5	Aktivasi endotel oleh ox-LDL melalui ikatannya dengan LOX-1.....	17
Gambar 2.6	Komponen penyusun vaksin DNA.....	24
Gambar 2.7	Mekanisme DNA sensing intraselular.....	27
Gambar 2.8	Mekanisme aksi vaksin DNA dalam menginduksi sistem imun.....	29
Gambar 5.1	Peta construct pGFP-LOX-1 dan pLOX-1 dengan plasmid pembawa pcDNA3.1(+).....	78
Gambar 5.2	Hasil elektroforesis agarose.....	79
Gambar 5.3	Analisa ekspresi GFP-LOX-1 dengan mikroskop fluoresensi.....	80
Gambar 5.4	Analisa ekspresi mRNA pada sel HeLa yang ditransfeksi	81
Gambar 5.5	Hasil analisa ekspresi protein LOX-1 dengan SDS-PAGE dan Western Blot.....	81
Gambar 5.6	Perbandingan ekspresi eNOS pada jaringan aorta dan nilai rata-rata persentase area yang mengekspresikan eNOS.....	83
Gambar 5.7	Perbandingan ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta yang dianalisa dengan metode imunofluoresensi.....	84
Gambar 5.8	Vaksin DNA LOX-1 dapat mencegah kerusakan struktur jaringan aorta tikus dengan diet tinggi lemak	88
Gambar 5.9	Perbandingan jumlah sel busa rata-rata pada jaringan aorta tikus.....	89
Gambar 5.10	Tingkat survival rate hewan coba.....	90
Gambar 6.1	Rencana <i>construct</i> pNZ8148 dengan gen sisipan GFP-LOX-1/GFP/LOX-1.....	121
Gambar 6.2	Produk amplifikasi gen penyandi GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1.....	123
Gambar 6.3	Hasil analisa restriksi pTOPO-LOX-1, pTOPO-GFP-LOX-1, pTOPO-GFP.....	123
Gambar 6.4	Hasil analisa restriksi pNZGFP-LOX-1, pNZGFP, dan pNZLOX-1.....	124
Gambar 6.5	Hasil analisa sekuensing menunjukkan terjadinya mutasi pada gen pengkode GFP dan GFP-LOX-1.....	125
Gambar 6.6	<i>Construct</i> pNZ8148 dengan gen sisipan GFP-LOX-1/GFP/LOX-1.....	126
Gambar 6.7	Hasil analisa restriksi pNZGFP-LOX-1, pNZGFP, dan pNZLOX-1.....	128
Gambar 6.8	Koloni <i>L.lactis</i> dengan pNZ GFP-LOX-1 dan pNZGFP.....	129
Gambar 6.9	Skrining koloni <i>L. lactis</i> dengan pNZGFP-LOX-1 dengan pendaran yang paling tinggi.....	129
Gambar 6.10	Hasil analisa ekspresi protein LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1 pada <i>L. lactis</i> NZ9000.....	130
Gambar 6.11	Perbandingan bobot badan, asupan pakan dan minum tikus kelompok control (GFP) dan kelompok perlakuan (GFP-LOX-1).....	132
Gambar 6.12	Perbandingan absorbansi IgG anti-LOX-1 antar kelompok perlakuan (GFP-LOX-1) dan kelompok kontrol (GFP)	133
Gambar 6.13	Deposisi lipid pada <i>abdominal mesenteric artery</i>	134

DAFTAR TABEL

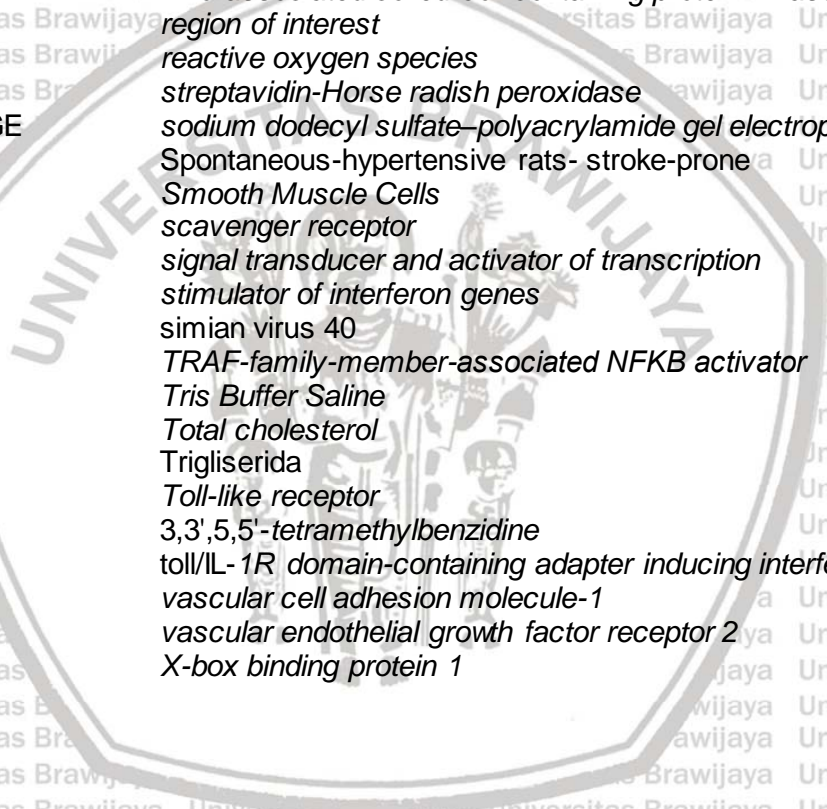
Tabel 5.1	Bahan Diet Normal untuk 1 kg Pakan	57
Tabel 5.2	Bahan Diet Tinggi Lemak untuk 1 kg Pakan	57
Tabel 5.3	Urutan primer yang digunakan untuk amplifikasi gen LOX-1 dan GFP LOX-1.....	67
Tabel 5.4	Kondisi Reaksi <i>One-Step</i> RT-PCR.....	68
Tabel 5.5	Perbandingan ekspresi eNOS pada jaringan aorta.....	81
Tabel 5.6	Perbandingan ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta yang dinyatakan dalam CTCF.....	84
Tabel 6.1	Primer untuk mengamplifikasi gen pengkode LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1.....	107
Tabel 6.2	Kondisi reaksi amplifikasi gen pengkode LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1.....	107
Tabel 6.3	Komposisi reaksi restriksi.....	110
Tabel 6.4	Peralatan dan reagen yang digunakan dalam penentuan profil lipid dan kadar elektrolit serum.....	117
Tabel 6.5	Perbandingan Profil Lipid Serum tikus kelompok kontrol (GFP) dan perlakuan (GFP-LOX-1).....	134



DAFTAR ISTILAH & SINGKATAN

5'UTR	5' <i>untranslated region</i>
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
Ang II	<i>angiotensin II</i>
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
	<i>beta</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CHOP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein</i>
CMV	<i>cytomegalo virus</i>
CTCF	<i>Corrected Total Cells Fluorescence</i>
CTL	<i>Cytolytic T cell</i>
CTLD	<i>C-type lectin-like domain</i>
CVD	<i>cardiovascular disease</i>
DAI	<i>DNA-dependent activator</i>
DEPC	<i>dietilpirokarbonat</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
eNOS	<i>endothelial NO synthase</i>
ET -1	<i>endothelin-1</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FLIP	<i>Fas-associated death domain-like interleukin-1-β converting enzyme-inhibitory protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GRP78	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>
HCAEC	<i>human coronary artery endothelial cells</i>
HDL	<i>High-density Lipoprotein</i>
HSF-1	<i>heat shock factor-1</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IRE1	<i>inositol requiring enzyme 1</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response elements</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
<i>L.lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LDL	<i>Low-density Lipoprotein</i>
LOX-1	<i>Lectin like oxidized-LDL receptor-1</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κβ	<i>nuclear factor kappa beta</i>
NKD	<i>natural killer domain</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
Ori	<i>origin of replication</i>
Ox-LDL	<i>oxidized-LDL</i>

PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate Buffer Saline – Tween20</i>
PC	<i>Phosphorylcholine</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PERK	<i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
pGFPLOX-1	<i>pcDNA3.1-GFP-CTLD-LOX-1</i>
PL	<i>Phospho-lipid</i>
pLOX-1	<i>pcDNA3.1-CTLD-LOX-1</i>
pNZGFP-LOX-11	<i>pNZ8148.GFP-CTLD-LOX-1</i>
pNZLOX-1	<i>pNZ8148.CTLD-LOX-1</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
rhoA	<i>Ras homolog gene family member A</i>
Riskesdas	<i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROCK	<i>Rho-associated coiled-coil containing protein kinase</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SA-HRP	<i>streptavidin-Horse radish peroxidase</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHR-SP	<i>Spontaneous-hypertensive rats- stroke-prone</i>
SMC	<i>Smooth Muscle Cells</i>
SR	<i>scavenger receptor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
SV40	<i>simian virus 40</i>
TANK	<i>TRAF-family-member-associated NFKB activator</i>
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TC	<i>Total cholesterol</i>
TG	<i>Trigliserida</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>
TRIF	<i>tol/IL-1R domain-containing adapter inducing interferon-</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGFR 2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 : Persetujuan Etik untuk Penelitian Tahap I
- Lampiran 2 : Data sekuen *rat* LOX-1 dari NCBI
- Lampiran 3 : Data sekuen eGFP dari NCBI
- Lampiran 4 : Hasil Sekuensing pLOX-1 dan pGFP-LOX-1
- Lampiran 5 : Hasil Uji Statistika Data Ekspresi eNOS
- Lampiran 6 : Hasil Uji Statistika Data Ekspresi LOX-1
- Lampiran 7 : Hasil Uji Statistika Data Jumlah Sel Busa
- Lampiran 8 : Persetujuan laik Etik untuk Penelitian Tahap II dengan Hewan Coba
- Lampiran 9 : Hasil Sekuensing pNZGFP-LOX-1, pNZGFP, pNZLOX-1
- Lampiran 10 : Hasil Sekuensing pNZGFP-LOX-1, pNZGFP, pNZLOX-1 dengan optimasi kodon
- Lampiran 11 : Hasil Uji Beda Data Kadar IgG Serum Anti-LOX-1 pada hari ke-35 setelah vaksinasi pertama
- Lampiran 12 : Hasil Uji Beda Data Kadar IgG Serum Anti-LOX-1 pada hari ke-56 setelah vaksinasi pertama
- Lampiran 13 : Area Deposisi Lipid pada *Abdominal Mesenteric Artery* SHR-SP
- Lampiran 14 : Hasil Uji Beda Data Jumlah Area Deposisi Lipid



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Aterosklerosis merupakan penyakit multifaktorial yang terjadi akibat pembentukan plak aterosklerosis yang menyebabkan penyempitan vaskular dan obstruksi aliran darah serta menimbulkan iskemia jaringan. Oleh sebab itu, penyakit ini dapat menimbulkan komplikasi yang fatal (Packard & Libby, 2008; Libby, 2003; Libby & Theroux, 2005). Hingga saat ini belum ada terapi pencegahan yang efektif untuk aterosklerosis. Perubahan pola makan dan gaya hidup pada umumnya terlambat dilakukan sehingga tidak dapat mencegah komplikasi lebih lanjut (Yang, *et al.*, 2010). Minimnya alternatif terapi pencegahan aterosklerosis membuka peluang untuk dikembangkannya jenis terapi pencegahan aterosklerosis yang baru.

Faktor resiko aterosklerosis diantaranya adalah dislipidemia, hipertensi, diabetes mellitus, kebiasaan merokok, dan obesitas yang dapat memicu terjadinya inflamasi vaskular sehingga menstimulasi pembentukan plak aterogenik. Faktor resiko aterosklerosis yang utama adalah dislipidemia yang salah satunya ditandai oleh tingginya kadar kolesterol LDL (Faxon, *et al.*, 2004; Pirillo, *et al.*, 2013).

Tingginya kadar kolesterol LDL ini seringkali diikuti dengan terbentuknya produk modifikasi dari LDL berupa LDL teroksidasi (*ox-LDL*) akibat paparan radikal bebas. *Ox-LDL* merupakan pemicu utama pembentukan plak aterosklerosis.

Selanjutnya *ox-LDL* akan ditangkap oleh reseptor permukaan sel endotel vaskular, misalnya *lectin-like oxidized LDL receptor protein-1* (LOX-1) yang merupakan reseptor utama *ox-LDL*.

LOX-1 merupakan protein transmembran yang terekspresi berlebihan pada permukaan sel endotel yang teraktivasi. Selain itu LOX-1 juga terdapat pada permukaan makrofag dan platelet teraktivasi. Pada sel endotel, ekspresi LOX-1 distimulasi oleh ikatannya dengan *ox-LDL*, *shear* stres, dan sitokin pro-aterosklerosis. Ikatan antara *ox-LDL* dengan LOX-1 berperan dalam memicu pelepasan faktor adhesin diantaranya *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), dan sitokin, misalnya *monocyte chemoattractant molecule-1* (MCP-1). Ikatan antara *ox-LDL* dengan LOX-1 juga menstimulasi proliferasi dan migrasi sel otot polos, apoptosis sel, serta meningkatkan ketidakstabilan plak pada tahap akhir aterosklerosis (Kelly, *et al.*, 2008; Mehta, *et al.*, 2006; Sun & Chen, 2011).

Penelitian yang dilakukan pada hewan coba menunjukkan bahwa pemberian antibodi anti-LOX-1 dapat memperbaiki dilatasi arteri yang dimediasi oleh *Nitric Oxide* (NO) pada mencit ApoE *-/-* (Xu, *et al.*, 2007). Secara *in vitro* pemberian antibodi anti-LOX-1 juga telah terbukti dapat menurunkan ekspresi *matrix metalloproteinase* (MMP), suatu protein yang berperan dalam menyebabkan ketidakstabilan plak aterosklerosis (Li, *et al.*, 2003). Pemberian anti-LOX-1 secara *in vivo* telah terbukti dapat memperbaiki disfungsi endotel pada arteri tikus aterosklerosis (Xu, *et al.*, 2007). Delesi gen penyandi LOX-1 pada tikus dapat mencegah aterosklerosis melalui penghambatan aktivasi jalur inflamasi dan pro-oksidan (Mehta, *et al.*, 2006). Penelitian lain menyatakan bahwa penghilangan gen penyandi LOX-1 dapat menekan deposisi kolagen dan ekspresi MMP (Hu, *et al.*, 2008).

Studi pendahuluan yang telah dilakukan secara *in silico* menunjukkan bahwa *C-type lectin-like domain* (CTLD) mengandung epitop yang dikenali oleh sel T dapat dipresentasikan oleh MHC kelas I, yaitu WLWEDGSPLM. Prediksi

antigenitas CTLD LOX-1 dilakukan dengan program *NetMHC 4.0*, *NetCTL.Pan 1.1*, *NetMHCStab 1.0*, dan *PickPocket 1.1* (Yurina, *et al.*, 2017). Prediksi epitope dengan *Bepipred Linear Epitope Prediction*, *Ellipro*, dan *Discotope* memperlihatkan adanya epitope yang dikenali oleh sel B, yaitu RNPSYPWLWEDGSPL. Kedua epitope tersebut saling berpotongan dan terletak pada bagian CTLD LOX-1.

Lebih lanjut, penelitian pendahuluan secara *in vivo* telah membuktikan bahwa vaksinasi protein LOX-1 pada tikus Wistar dengan diet aterosogenik dapat menurunkan pembentukan sel busa, ketebalan dinding aorta, dan aktivasi NF- κ B, serta meningkatkan kadar eNOS dibandingkan tikus Wistar yang tidak mendapatkan vaksinasi. Vaksinasi diberikan dengan variasi dosis 1-1000 ng dan dengan menggunakan alum sebagai adjuvan (Adianingsih, *et al.*, 2016). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, melalui penelitian ini ingin dikembangkan potensi LOX-1 sebagai kandidat terapi pencegahan aterosklerosis melalui pendekatan vaksin DNA dan vaksin subunit rekombinan dengan pembawa bakteri.

Vaksin DNA merupakan jenis vaksin baru yang terbukti memiliki keunggulan dibandingkan vaksin konvensional, yaitu mampu memicu respon imun selular serta lebih stabil dalam proses penyimpanan dan distribusinya (Donnelly, *et al.*, 2005; Li, *et al.*, 2012). Vaksin DNA juga sudah dikembangkan untuk mencegah aterosklerosis, misalnya penggunaan gen penyandi reseptor angiotensin (Hauer, *et al.*, 2009) dan gen penyandi *vascular endotel growth faktor receptor 2* (VEGFR2) (Petrovan, *et al.*, 2007). Kedua vaksin DNA tersebut secara *in vivo* telah berhasil mencegah pembentukan plak aterosklerosis melalui induksi sistem imun selular dengan perantaraan sel T sitolitik CD8+. Walaupun pendekatan yang digunakan dalam penelitian ini serupa dengan penelitian

terdahulu tersebut, namun, penelitian ini menekankan pada protein yang berbeda, yaitu LOX-1 sebagai antigen. Dalam penelitian ini diharapkan vaksin DNA LOX-1 bekerja melalui induksi respon imun selular maupun humoral.

Pada studi lain, pemberian vaksin subunit rekombinan LOX-1 (subunit LOX-1) dilakukan dengan menggunakan *Lactococcus lactis* sebagai pembawa. *L. lactis* merupakan bakteri yang aman dikonsumsi dan telah lama digunakan dalam penelitian kesehatan (Bermúdez-Humarán, *et al.*, 2011). Pemberian *L. lactis* secara oral sebagai pembawa vaksin subunit dapat meningkatkan respon imun baik sistem imun mukosal maupun sistemik (Bahey-El-Din, 2012; Chamcha, *et al.*, 2015; Sáez, *et al.*, 2012).

Penghambatan aktivitas LOX-1 dengan pemberian antibodi anti-LOX-1 (Xu *et al.*, 2007) dan penghapusan nukleotida pada gen penyandi LOX-1 telah terbukti dapat mencegah aterosklerosis (Hu, *et al.*, 2008; Mehta, *et al.*, 2007). Namun, pemanfaatan LOX-1 sebagai anti-aterosklerosis dengan pendekatan vaksinasi belum pernah dilakukan sebelumnya. Melalui penelitian tahap I diharapkan dapat diketahui efektivitas vaksin DNA LOX-1 dalam mencegah kerusakan struktur intima media aorta dan pembentukan sel busa, menurunkan ekspresi LOX-1, serta mencegah penurunan ekspresi eNOS pada jaringan aorta tikus (*R. norvegicus*) strain Wistar dengan diet tinggi lemak. Dalam penelitian tahap II diuji efektivitas vaksin subunit LOX-1 dalam mencegah deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* pada *spontaneous hypertensive rats-stroke prone* (SHR-SP) dengan diet tinggi lemak.

1.2. Rumusan masalah

1.2.1. Rumusan masalah umum

1. Apakah pemberian vaksin DNA LOX-1 dapat menghambat disfungsi endotel dan pembentukan sel busa pada jaringan aorta tikus (*R. norvegicus*) strain Wistar?
2. Apakah pemberian vaksin subunit LOX-1 dapat menghambat deposisi lipid pada jaringan *abdominal mesenteric artery* SHR-SP?

1.2.2. Sub masalah

1. Apakah sel mamalia (sel HeLa) yang telah ditransfeksi dengan vaksin DNA LOX-1 dapat mengekspresikan LOX-1?
2. Apakah vaksin DNA LOX-1 dapat menurunkan jumlah sel busa pada jaringan aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak?
3. Apakah vaksin DNA LOX-1 dapat menurunkan ekspresi LOX-1 pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak?
4. Apakah vaksin DNA LOX-1 dapat mencegah penurunan ekspresi eNOS pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak?
5. Apakah sel *L. lactis* yang diinduksi dengan nisin dapat mengekspresikan LOX-1 rekombinan (subunit LOX-1)?
6. Apakah vaksin subunit LOX-1 dapat menurunkan jumlah area deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan diet tinggi lemak?
7. Apakah vaksin subunit LOX-1 dapat meningkatkan kadar antibodi anti-LOX-1 pada serum SHR-SP dengan diet tinggi lemak?
8. Apakah vaksin subunit LOX-1 dapat menurunkan kadar lipid serum SHR-SP dengan diet tinggi lemak?

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menentukan pengaruh pemberian vaksin DNA LOX-1 dalam menghambat disfungsi endotel dan pembentukan sel busa pada jaringan aorta tikus (*R. norvegicus*) strain Wistar.
2. Menentukan pengaruh pemberian vaksin subunit LOX-1 dalam menghambat deposisi lipid pada jaringan *abdominal mesenteric artery* SHR-SP.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Menentukan ekspresi LOX-1 pada sel mamalia (sel HeLa) yang telah ditransfeksi dengan vaksin DNA LOX-1.
2. Menentukan penurunan jumlah sel busa pada jaringan aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1.
3. Menentukan ekspresi LOX-1 pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1.
4. Menentukan ekspresi eNOS pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1.
5. Menentukan ekspresi LOX-1 rekombinan pada *L. lactis* yang diinduksi dengan nisin.
6. Menentukan jumlah area deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1.

7. Menentukan kadar antibodi anti-LOX-1 pada serum SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1.

8. Menentukan profil lipid serum SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat teoritis

Memberi kontribusi pada ilmu pengetahuan tentang potensi pencegahan aterosklerosis melalui vaksinasi LOX-1 pada tikus model aterosklerosis.

1.4.2. Manfaat praktis/klinis

Dengan diketahuinya efektivitas vaksin LOX-1 dapat dikembangkan kandidat vaksin yang potensial untuk mencegah aterosklerosis melalui kerjasama dengan industri vaksin.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Aterosklerosis

2.1.1. Prevalensi aterosklerosis

Aterosklerosis merupakan inflamasi kronis yang menjadi penyebab utama berbagai penyakit kardiovaskular, di antaranya *stroke*, penyakit jantung koroner, dan penyakit vaskular perifer lainnya. Aterosklerosis adalah penyakit kronis progresif yang tidak menunjukkan gejala dalam waktu yang lama. Manifestasi klinis dari aterosklerosis dapat muncul pada 2 dari 3 pria dan 1 dari 2 wanita yang berusia di atas 40 tahun (Robinson, *et al.*, 2009). Berdasarkan data *Framingham Heart Study* tahun 1980-2003, insiden penyakit kardiovaskular mengalami peningkatan berdasarkan usia. Pada usia 75-84 tahun, insiden penyakit kardiovaskular sebesar 59,2 per 1.000 penduduk pertahun sementara pada usia 85 tahun ke atas insidennya mencapai 74,4 per 1.000 penduduk per tahun (Mozaffarian, *et al.*, 2015).

Di seluruh dunia, penyakit kardiovaskular masih menjadi penyebab utama kematian, bahkan hingga di masa mendatang. Pada tahun 2005, diperkirakan 17,5 juta kematian di dunia disebabkan oleh penyakit jantung vaskular, angka ini menunjukkan 30% penyebab kematian di seluruh dunia. Saat ini telah terjadi peningkatan kematian akibat penyakit jantung vaskular, pada tahun 1990 jumlah kematian akibat penyakit jantung vaskular adalah 10 juta kematian sedangkan pada tahun 2010 menjadi 13 juta kematian. Kematian akibat penyakit jantung vaskular di negara dengan pendapatan rendah dan menengah menempati 80% dari semua kasus kematian akibat penyakit jantung vaskular di seluruh dunia (Fowkes, *et al.*, 2013; Rodriguez-Saldaña, *et al.*, 2014).

Walaupun di negara maju terjadi penurunan persentasi kematian akibat penyakit jantung vaskular sebesar 15,5% dari tahun 2001 hingga 2011 tetapi pada tahun 2011 penyakit jantung vaskular masih menjadi penyebab kematian 31,3% dari seluruh kematian atau menyebabkan 1 kematian dari 3 kematian. Berdasarkan data tersebut, tiap 40 detik terjadi 1 kematian akibat penyakit jantung vaskular (Mozaffarian, *et al*, 2015).

Di negara dengan pendapatan rendah dan menengah, peningkatan angka penyakit jantung vaskular terjadi karena beberapa hal sebagai berikut: (1) tingginya paparan faktor resiko penyakit jantung vaskular, seperti misalnya kebiasaan merokok dan pola makan yang tidak sehat, (2) minimnya terapi preventif yang dilakukan karena rendahnya tingkat pemahaman dan pendidikan, (3) rendahnya akses kesehatan yang memadai (Rodríguez-Saldaña, *et al*, 2014).

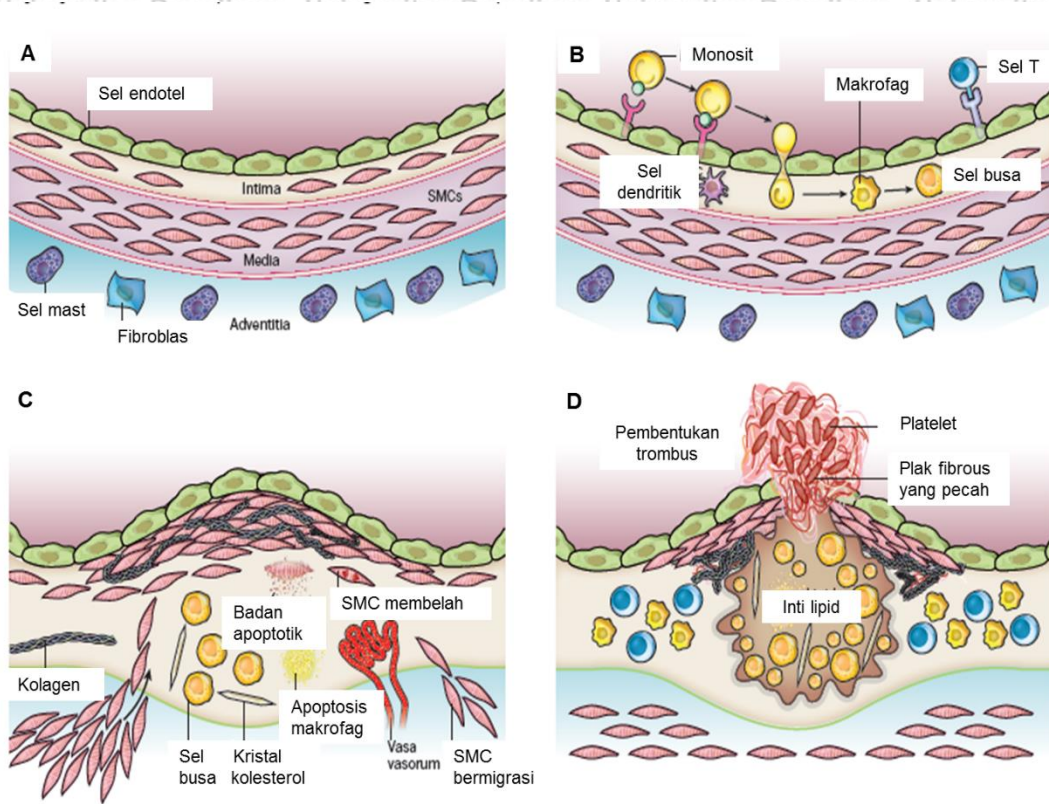
Sebagai negara berkembang, Indonesia juga mengalami peningkatan prevalensi penyakit jantung vaskular. Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013 menunjukkan bahwa penyakit jantung vaskular masih menjadi penyebab utama kematian akibat penyakit non infeksi. Data Riskesdas 2013 juga menunjukkan bawa prevalensi tertinggi penyakit jantung koroner berada pada masyarakat tidak bersekolah dan tidak bekerja. Demikian pula prevalensi *stroke* tertinggi juga terdeteksi pada masyarakat yang tidak bersekolah dan tidak bekerja (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013).

2.1.2. Patofisiologi aterosklerosis

Aterosklerosis diawali dengan terjadinya pengikatan *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang teroksidasi (*oxidized-LDL /ox-LDL*) oleh *scavenger receptor* (SR) yang ada di permukaan sel endotel. Beberapa jenis SR yang telah diketahui diantaranya SR-A, SR-BI, CD36, and *lectin-like oxidized low-density*

lipoprotein receptor-1 (LOX-1). LOX-1 adalah reseptor utama *ox-LDL* pada sel endotel (Pirillo, *et al*, 2013) karena *ox-LDL* memiliki afinitas paling tinggi dengan LOX-1. Protein LOX-1 membentuk ikatan *ox-LDL* dengan SR mengaktifasi endotel melalui peningkatan aktivitas faktor transkripsi *Nuclear faktor kappa B* (NF- κ B), yang diikuti dengan peningkatan ekspresi molekul *adhesin* yang memediasi pengikatan leukosit (monosit dan sel T) pada endotel. Beberapa molekul *adhesin* yang ekspresinya meningkat akibat pengikatan *ox-LD* dengan reseptornya misalnya E-selectin, P-selectin, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). Peningkatan aktivitas NF- κ B juga diikuti dengan modulasi gen pro-inflamasi, ekspresi sitokin, dan *chemokine* (Jan, *et al*, 2010).

Monosit yang teraktivasi akan mengalami diferensiasi menjadi makrofag dan meningkatkan ekspresi SR serta *Toll-like receptor* (TLR). Reseptor-reseptor ini selanjutnya akan memfasilitasi internalisasi *ox-LDL* ke dalam monosit sehingga terjadi akumulasi lipid di dalam makrofag dan terbentuk sel busa. Selain itu makrofag yang teraktivasi akan melepaskan sitokin proinflamasi, spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species* /ROS) dan enzim proteolitik. Lebih lanjut, enzim proteolitik akan menyebabkan degradasi matriks dan ketidakstabilan plak (Jan, *et al.*, 2010; Faxon, *et al.*, 2004). Pecahnya plak tersebut menyebabkan trombosis yang selanjutnya dengan aktivasi sistem koagulasi menimbulkan hambatan aliran darah dan manifestasi klinis (Frostegård, 2013). Secara garis besar mekanisme aterosklerosis dapat dilihat pada Gambar 2.1.

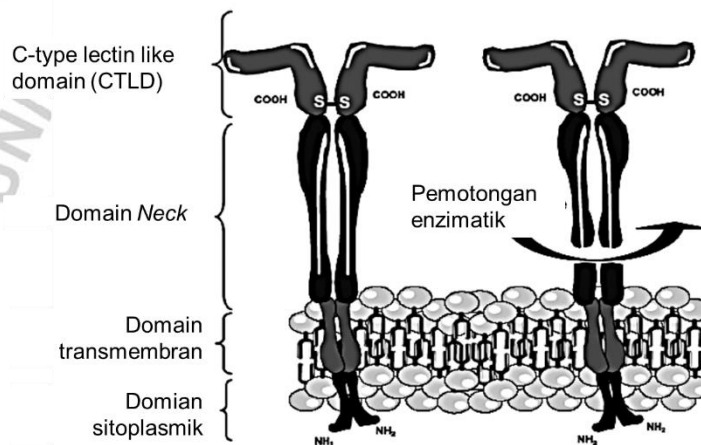


Gambar 2.1. Tahap perkembangan plak aterosclerosis. A. Arteri normal yang terdiri dari 3 lapisan: *tunica intima* (terdiri dari selapis sel endotel yang juga mengandung SMC), *tunica media* (terdiri dari SMC dan ECM), dan *adventitia* (mengandung sel mast, ujung saraf, dan pembuluh darah mikro). B. Tahap inisiasi aterosklerosis ditandai dengan penempelan leukosit pada sel endotel yang teraktivasi, migrasi leukosit menuju intima, maturasi monosit menjadi makrofag, serta masuknya sel lipid ke dalam makrofag sehingga terbentuk sel busa. C. Progresi lesi ditandai dengan migrasi SMC dari media ke intima, proliferasi SMC intima dan peningkatan sintesis makromolekul ECM, misalnya kolagen, elastin, dan proteoglikan. Pada tahap perkembangan selanjutnya dapat terjadi apoptosis makrofag dan SMC yang akan terakumulasi membentuk inti lipid. D. Tahap trombosis, merupakan tahap komplikasi aterosklerosis, dapat ditandai dengan pecahnya plak yang diikuti dengan rekuritmen komponen pembekuan darah dan pembentukan trombus yang menghambat aliran darah (Libby, et al., 2011).

2.2. Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1)

2.2.1 Struktur dan regulasi ekspresi Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1)

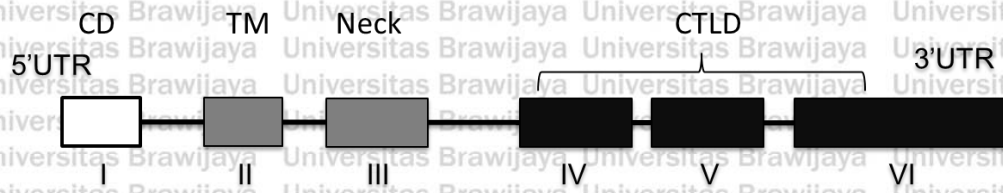
Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) merupakan protein dimer yang berukuran 273 asam amino yang terdiri dari 4 domain, yaitu: domain sitoplasmik yang pendek (asam amino 1-33), domain transmembran tunggal (asam amino 34-60), domain NECK (asam amino 61-142), dan *C-type lectin-like domain* (CTLD) (asam amino 143-273) (Gambar 2.2) (Mehta, *et al.*, 2006). Daerah NECK-CTLD LOX-1 menunjukkan persamaan dengan protein reseptor *natural killer* yang disebut dengan *natural killer domain* (NKD) (Tate, 2006).



Gambar 2.2. Domain Penyusun Protein LOX-1. LOX-1 terdiri dari empat domain, yaitu *C-type lectin-like* domain, Neck domain, transmembran domain, dan *cytoplasmic* domain. Neck domain dapat mengalami pemotongan oleh enzim yang belum diketahui sehingga membentuk soluble LOX-1 (Navarra, *et al.*, 2010).

Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) disandi oleh gen *olr1* yang terdiri dari 6 ekson sepanjang kurang lebih 15 kilo basa (kb) yang terletak pada daerah kromosom 12p12.3-13.2. Ekson 1 menyandi daerah 5' *untranslated* dan domain sitoplasmik, ekson 2 menyandi sebagian dari domain sitoplasmik dan

domain transmembran. Ekson 3 menyandi domain NECK, sementara ekson 4-6 menyandi CTLD dan daerah 3' untranslated (Gambar 2.3) (Sawamura, 2004; Navarra, et al., 2010).



Gambar 2.3. Skema gen OLR1. Gen OLR1 terdiri dari 6 ekson. Keterangan: CD: domain sitoplasmik, TM: domain transmembran, CTLD: C-type lectin like domain, UTR: untranslated daerah (Navarra, et al., 2010).

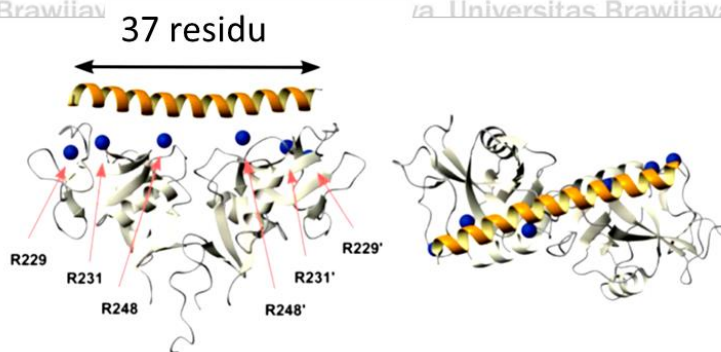
Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) membentuk homodimer dengan ikatan disulfida yang tidak terkonservasi pada ortolog LOX-1 yang berbeda. Ikatan disulfida ini juga tidak berperan krusial dalam pengikatan LOX-1 dengan *ox-LDL*. Hal ini dibuktikan dari penelitian dengan mutasi C-140S yang tidak memungkinkan pembentukan ikatan disulfida tetapi LOX-1 mutan tetap menunjukkan aktivitas pengikatan dengan *ox-LDL* dan sebaliknya mengalami penurunan aktivitas pengikatan dengan molekul yang lebih besar. Hal ini menunjukkan bahwa ikatan disulfida tidak berperan dalam stabilisasi dimer LOX-1, tetapi diduga stabilisasi dimer diperantarai oleh domain NECK yang lebih *conserved* pada berbagai ortolog LOX-1. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa pada domain NECK terdapat patahan yang berperan dalam pemutusan LOX-1 dari membran sehingga membentuk LOX-1 terlarut, pemutusan LOX-1 diperantari oleh suatu enzim yang belum diketahui. Selain itu, bagian C terminal NECK domain membentuk struktur melingkar yang diketahui berperan dalam menjaga jarak yang tetap antara kedua dimer CTLD (Park, et al., 2005).

Bagian CTLD berperan penting dalam pengikatan dengan ligannya, termasuk dengan *ox-LDL*. Dibandingkan dengan protein sejenis lainnya, bagian CTLD dari LOX-1 merupakan bagian yang *hipervariable* terutama pada *long loop region* (LLR), yang menunjukkan spesifisitasnya terhadap pengenalan ligan. Pada CTLD juga terdapat residu-residu yang bersifat basa. Residu basa ini, terutama tersusun dari asam amino arginin, berperan penting dalam pengikatan dengan *ox-LDL*, mutasi pada basa ini menurunkan aktivitas pengikatan *ox-LDL* secara signifikan (Chen, *et al.*, 2001; Francone, *et al.*, 2009). Bagian pengikatan dengan ligan pada CTLD secara umum bersifat hidrofob dibandingkan dengan bagian lain dari CTLD. Daerah yang bersifat hidrofob ini membentuk suatu struktur terowongan dengan ukuran diameter $\sim 7-8 \text{ \AA}$ dan volume $\sim 380 \text{ \AA}^3$. Mutasi yang dilakukan pada asam amino penyusun terowongan tersebut menurunkan aktivitas pengikatan *ox-LDL* pada LOX-1 (Francone, *et al.*, 2009).

Residu W150 diketahui juga berperan penting dalam pembentukan dimer dan proses *fold*ing yang tepat serta terlibat dalam pembentukan ikatan hidrogen intra dan inter dimer. Mutasi pada residu W150 mengganggu struktur basa sehingga menurunkan aktivitas pengikatan LOX-1 secara drastis. Residu W150 juga berperan penting dalam pembentukan rongga pada struktur dimer LOX-1. Substitusi W150 dengan residu yang lebih tebal diketahui mengganggu struktur rongga sehingga menghambat pengikatan LOX-1 dengan ligannya (Nakano, *et al.*, 2012).

Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) juga diketahui memiliki kecenderungan untuk berikatan dengan molekul bermuatan negatif, termasuk *ox-LDL*. LOX-1 berikatan dengan *ox-LDL* pada 37 residu dari α heliks apolipoprotein B (Gambar 2.4). Penelitian menunjukkan adanya pengulangan 22-mer pada

daerah *amphiphilic* α heliks yang berperan penting pada pengikatan dengan *basic spine*. Peningkatan muatan negatif LDL akibat oksidasi meningkatkan afinitas pengikatan *ox-LDL* dengan LOX-1 (Tate, 2006).



Gambar 2.4 Pengikatan 37 α heliks residu *ox-LDL* dengan LOX-1. LOX-1 mengandung banyak residu basa yang terdiri dari asam amino arginin yang berperan krusial dalam aktivitas pengikatannya. (Tate, 2006).

Homodimer LOX-1 tersusun secara berkelompok pada permukaan sel membentuk *hexamer*, yang terdiri dari 3 unit *homodimer* LOX-1. Hal ini menunjukkan bahwa LOX-1 dapat berikatan dengan beberapa daerah pada daerah *amphiphathic ox-LDL*. Ikatan *ox-LDL* dengan *hexamer* LOX-1 membentuk kompleks yang kuat dibandingkan dengan ikatan tunggal *ox-LDL* dengan *homodimer* LOX (Tate, 2006). Struktur ini menyebabkan *ox-LDL* memiliki afinitas pengikatan paling tinggi dengan LOX-1 dibandingkan dengan reseptor permukaan lainnya.

Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) ditranslasikan dalam bentuk pre-LOX berukuran 40 kDa yang mengandung gugus manosa pada ujung N. Modifikasi lebih lanjut menghasilkan LOX-1 matang yang terlikosilasi dengan ukuran 48 kDa melalui pemrosesan di badan Golgi. Glikosilasi pada ujung N ini berperan penting dalam transpor LOX-1 menuju ke membran sel. Penghilangan

ujung N terglisosilasi menurunkan transport LOX-1 menuju ke membran sel. Ujung N terglisosilasi ini juga berperan penting dalam pembentukan konformasi LOX-1 yang memungkinkan pengikatannya dengan liganinya (Kataoka, *et al.*, 2000).

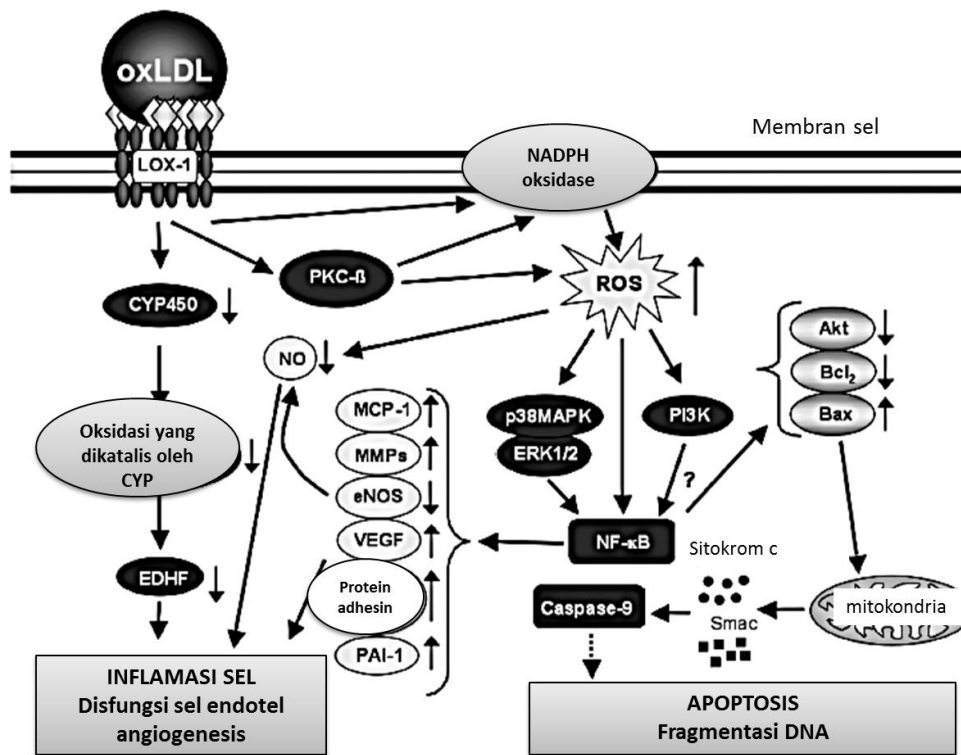
Dalam kondisi basal, ekspresi LOX-1 pada sel endotel sangat rendah. Peningkatan ekspresi LOX-1 dalam kondisi *in vitro* dipicu oleh berbagai faktor pro-inflamasi, pro-oksidan, dan tekanan mekanik, seperti misalnya TNF- α , ox-LDL, dan shear stres. Faktor-faktor tersebut secara umum merupakan faktor yang terdapat pada daerah plak aterosklerosis. Ekspresi LOX-1 ditingkatkan oleh ox-LDL melalui pengikatan ox-LDL dengan motif Oct-1 pada nukleotida ke -1556. Peningkatan jumlah LOX-1 di permukaan sel akan diikuti dengan peningkatan jumlah ox-LDL yang terikat, hal ini berperan sebagai *positive feedback loop* yang lebih lanjut akan berfungsi sebagai pemicu ekspresi LOX-1. Sementara Angll diketahui meningkatkan ekspresi LOX-1 melalui motif NF-kb pada nukleotida ke -2158. Ekspresi LOX-1 juga ditingkatkan melalui motif AP-1 pada nukleotide ke-62 (Hermonat, *et al.*, 2011).

Secara *in vivo*, dalam kondisi normal, endotel mengekspresikan LOX-1 dalam jumlah yang sangat rendah. Kondisi yang dapat memicu terjadinya peningkatan ekspresi LOX-1 adalah hipertensi, diabetes, dan hiperlipidemia. Terjadinya peningkatan ekspresi LOX-1 diamati pada hewan coba tikus hipertensi, kelinci hiperlipidemia, dan tikus diabetes. Ekspresi LOX-1 pada jaringan adiposa juga diketahui meningkat pada hewan coba yang menerima diet tinggi lemak. Kondisi-kondisi tersebut adalah faktor resiko dan terkait erat dengan terjadinya aterosklerosis (Mehta, *et al.*, 2006; Yoshimoto, *et al.*, 2011).

2.2.2. Peran LOX-1 dalam aterosklerosis

2.2.2.1 Peran LOX-1 dalam disfungsi dan aktivasi sel endotel

Pengikatan *ox-LDL* dengan LOX-1 di permukaan sel endotel mengakibatkan beberapa perubahan pada endotel, meliputi stimulasi ekspresi protein *adhesin*, penurunan ekspresi *endotel NO syntase* (eNOS) (Navarra, *et al.*, 2010), peningkatan stres oksidatif intraselular (Mollace, *et al.*, 2015), induksi angiogenesis (Camaré *et al.*, 2015), pelepasan MMP (Sugimoto, *et al.*, 2009), dan induksi apoptosis (Mollace, *et al.*, 2015) (Gambar 2.5).



Gambar 2.5. Aktivasi endotel oleh ox-LDL melalui ikatannya dengan LOX-1.

Pada kadar rendah, *ox-LDL* memicu aktivasi PKC dan meningkatkan pembentukan ROS melalui NAD(P)H oksidase yang diikuti dengan aktivasi jalur P38MAPK/Erk1/2 dan NF-κB yang memicu ekspresi berbagai gen yang terlibat dalam aterosklerosis. Pada kadar tinggi, *ox-LDL* akan memicu penurunan Akt-2 yang berujung pada terjadinya apoptosis melalui caspase 9 (Navarra, *et al.*, 2010).

Sel endotel memproduksi mediator-mediator yang berperan dalam mempertahankan tonus dan homeostasis pembuluh darah. Mediator yang dianggap berperan penting diantaranya adalah NO yang dihasilkan oleh eNOS yang terutama berperan sebagai vasodilator. Adanya disfungsi endotel ditandai dengan terjadinya penurunan kadar NO yang signifikan. NO juga diketahui berperan dalam proses regenerasi endotel yang mengalami kerusakan. Endotel yang mengalami degradasi digantikan melalui dua mekanisme, yaitu proliferasi sel endotel di sekitarnya dan perekrutan sel progenitor endotel yang bersirkulasi secara sistemik. Penelitian membuktikan bahwa jumlah sel progenitor endotel sebanding dengan kadar NO dalam darah. Tingginya kadar NO menunjukkan semakin baiknya proses regenerasi endotel yang terjadi (Deanfield, *et al.*, 2007).

Dalam kondisi aterosklerosis, terjadi penurunan bioavailabilitas NO karena degradasi NO akibat peningkatan pembentukan ROS. Ikatan *ox-LDL* dengan LOX-1 memfasilitasi penurunan NO melalui pembentukan peroksinitrat sitotoksik (ONOO-) (Xu, *et al.*, 2014; Pirillo, *et al.*, 2013). Ikatan *ox-LDL* dengan LOX-1 juga memicu terbentuknya radikal superoksida melalui aktivasi NAD(P)H oksidase (Xu, *et al.*, 2007).

ox-LDL juga mengaktifasi arginase II melalui interaksi dengan LOX-1, *small GTPase*, RhoA (*Ras homolog gene family member A*), dan ROCK (*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*). Arginase II merupakan enzim yang mengatur produksi NO melalui kompetisi dengan eNOS. Adanya aktivasi arginase II akan menurunkan produksi NO dan meningkatkan ROS (Xu, *et al.*, 2014; Pirillo *et al.*, 2013). Penelitian *in vivo* membuktikan terjadinya penghambatan vasodilatasi melalui penurunan NO sementara penambahan antibodi anti-LOX-1 dapat mencegah penurunan NO pada tikus *knock out ApoE* (Xu, *et al.*, 2007). Hal

ini juga dibuktikan pada penelitian lain yang menggunakan tikus *knock out* LOX-1, adanya delesi LOX-1 mampu memperbaiki kondisi endotel melalui penurunan eNOS dan protein pro-oksidan (Mehta, *et al.*, 2007).

Endotel yang telah mengalami disfungsi akan menghasilkan faktor vasokonstriksi, diantaranya endothelin-1 (ET-1) dan angiotensin II (Ang II). ET-1 merupakan mediator vasokonstriktor yang distimulasi pembentukannya oleh ox-LDL dan sebaliknya ET-1 meningkatkan ambilan ox-LDL melalui stimulasi produksi LOX-1. Ang II menginduksi ekspresi LOX-1 dan memfasilitasi masuknya ox-LDL, sebaliknya ox-LDL juga meningkatkan produksi *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) yang berperan dalam mengubah Ang I menjadi Ang II (Pirillo, *et al.*, 2013; Mehta, *et al.*, 2006). Studi yang dilakukan oleh Xu, *et al.*, 2007 membuktikan bahwa pemberian antibodi anti-LOX-1 mampu mencegah terjadinya vasokonstriksi (Xu, *et al.*, 2007).

2.2.2.2. Peran LOX-1 dalam adhesi dan rekrutmen monosit

Ikatan antara ox-LDL dan LOX-1 menginduksi transduksi signal melalui jalur Rho, Rac, p38 MAPK, p44/42MAPK, PKC, PKB, ERK1/2, PTK dan NF- κ B. Aktivasi NF- κ B berperan dalam regulasi ekspresi gen-gen yang terkait dengan aterosklerosis, misalnya faktor *adhesin*, sitokin, *chemokine*, protein anti-apoptosis dan protein anti-oksidan (Gareus, *et al.*, 2008). Molekul *adhesin* yang ekspresinya mengalami peningkatan akibat aktivasi NF- κ B diantaranya E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1 dan MCP-1 (Ogura, *et al.*, 2009). Penelitian yang dilakukan secara *in vitro* juga menunjukkan bahwa fibroblas yang ditransfeksi dengan plasmid LOX-1 mengalami peningkatan ekspresi faktor *adhesin*, meliputi ICAM-1, VCAM-1, dan MMP (Chen, *et al.*, 2005). Peningkatan jumlah molekul *adhesin* akan memicu terjadinya pengikatan monosit. Selanjutnya monosit akan berkembang

menjadi makrofag. Adanya *scavenger receptor*, termasuk LOX-1, di permukaan makrofag akan memfasilitasi *ambilan ox-LDL* sehingga makrofag akan mengalami perkembangan menjadi sel busa (Sawamura, *et al.*, 2015).

2.2.2.3. Peran LOX-1 dalam apoptosis sel endotel, SMC, dan makrofag

Studi yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa *ox-LDL* melalui LOX-1 menginduksi apoptosis sel endotel. Pengikatan *ox-LDL* pada LOX-1 menurunkan protein anti-apoptosis c-IAP-1 (*inhibitory apoptotic protein-1*) dan Bcl-2 tetapi tidak mempengaruhi protein pro-apoptosis seperti Fas dan FLIP (*Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein*). Lebih lanjut, *ox-LDL* juga mengaktifasi caspase-9 dan caspase-3. Penelitian menunjukkan bahwa *antisense* dan caspase-9 inhibitor menghambat apoptosis sel endotel yang dipicu oleh *ox-LDL*. Hal ini menunjukkan bahwa pengikatan *ox-LDL* dengan LOX-1 menurunkan ekspresi protein anti-apoptosis Bcl2 dan c-IAP-1 serta mengaktifasi caspase-9 dan caspase-3 yang berujung pada terjadinya apoptosis sel endotel (Li, *et al.*, 2010).

Penelitian yang lain mengungkapkan bahwa *ox-LDL* menginduksi apoptosis sel endotel secara tergantung pada dosis dan waktu. Mekanisme apoptosis terjadi melalui jalur stres retikulum endoplasma (ER) dengan aktivasi CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) dan caspase-12. *Silencing* gen penyandi LOX-1 (*OLR1*) dan antibodi anti-LOX-1 menurunkan apoptosis endotel dan stres ER terhadap *ox-LDL*. Peningkatan stres ER karena *ox-LDL* ditandai dengan aktivasi sensor stres ER, yaitu *inositol requiring enzyme 1* (IRE1), *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), dan *activating transcription faktor 6* (ATF6) serta peningkatan ekspresi protein X-box

binding protein 1 (XBP1), *c-Jun N-terminal kinases* (JNK), CHOP, dan KDEL *chaperones*, 78 kDa *glucose-regulated protein* (GRP78) (Hong, *et al.*, 2014).

Apoptosis SMC vaskular yang diperantarai oleh LOX-1 terjadi melalui jalur yang sama dengan apoptosis sel endotel, yaitu melalui gangguan kesetimbangan Bax/Bcl1. Apoptosis SMC vaskular pada daerah aterosklerosis terbukti dapat meningkatkan perkembangan plak, meningkatkan kalsifikasi intima, dan menyebabkan ketidakstabilan plak (Clarke, *et al.*, 2006; Clarke, *et al.*, 2008; Rudijanto, 2007).

Berbeda dengan pada sel endotel dan SMC, apoptosis makrofag pada daerah aterosklerosis tidak diperantarai oleh LOX-1 tetapi melibatkan *scavenger receptor* yang lain. Apoptosis makrofag pada tahap awal aterosklerosis menekan perkembangan plak melalui penurunan sekresi sitokin pro-inflamasi. Sedangkan pada aterosklerosis yang telah berkembang lebih lanjut, apoptosis makrofag akan menimbulkan debris nekrosis yang berperan dalam stimulasi inflamasi, ketidakstabilan plak, dan trombosis akut (Liu, *et al.*, 2005; Seimon & Tabas, 2009).

2.2.2.4. Peran LOX-1 dalam aktivasi platelet dan ketidakstabilan plak

Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) berperan dalam ketidakstabilan plak aterosklerosis melalui induksi ekspresi MMP dan *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1). Studi yang dilakukan oleh Li *et al.*, 2003 membuktikan bahwa *ox-LDL* melalui LOX-1 meningkatkan ekspresi MMP-1 dan MMP-3 pada sel *human coronary artery endotel cells* (HCAECs). Induksi ekspresi MMP-1 dan MMP-3 tersebut diperantarai oleh jalur PKC- β (Li, *et al.*, 2003). Studi lainnya yang dilakukan oleh Ishino menunjukkan bahwa LOX-1 menginduksi peningkatan jumlah MMP, terutama MMP-9 yang terbukti dapat meningkatkan ketidakstabilan plak aterosklerosis pada tikus hiperkolesterolemia. Selain melalui peningkatan

jumlah MMP, LOX-1 juga menginduksi ketidakstabilan plak melalui peningkatan ekspresi MCP-1 yang berperan dalam rekrutmen dan aktivasi monosit. Monosit yang teraktivasi akan mengekspresikan sitokin-sitokin proinflamasi yang mengurangi kestabilan plak aterosklerosis (Ishino, *et al.*, 2007).

Ox-LDL melalui pengikatannya dengan LOX-1 akan meningkatkan produksi ROS yang juga berperan dalam peningkatan ekspresi *heat shock faktor-1* (HSF-1). HSF-1 akan meningkatkan ekspresi PAI-1 melalui ikatannya dengan homolog HSF-1 pada promotor PAI-1. Peningkatan ekspresi PAI-1 dilihat melalui peningkatan mRNA PAI-1 yang mencapai puncaknya 12 jam setelah inkubasi sel dengan ox-LDL. Penelitian oleh Sangle *et al.*, 2008 ini juga membuktikan bahwa ox-LDL melalui LOX-1 mengaktifasi H-Ras, Raf-1/ERK1/2 yang akan meningkatkan transkripsi PAI-1 yang berperan dalam trombosis (Sangle, *et al.*, 2008).

Jumlah sel yang mengalami apoptosis pada daerah plak juga berkorelasi dengan kerentanan terjadinya *rupture*. Seperti telah dibahas sebelumnya, ikatan oxLDL dengan LOX-1 memicu terjadinya apoptosis sel endotel dan SMC. Plak mengalami kecenderungan untuk *rupture* pada area yang mengalami peningkatan jumlah makrofag dan penurunan SMC, menunjukkan bahwa apoptosis SMC dan peningkatan jumlah makrofag berperan dalam ketidakstabilan plak (Mango, *et al.*, 2011).

Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) juga diekspresikan pada platelet yang teraktivasi, sementara pada platelet yang belum teraktivasi, pengikatan ox-LDL diperantarai oleh CD36. Pada kondisi teraktivasi, di mana jumlah ox-LDL lebih banyak, ambilan ox-LDL diperantarai oleh LOX-1 dan CD36 sekaligus. Ambilan ox-LDL ke dalam platelet akan mengakibatkan peningkatan

kemampuan platelet untuk berikatan dengan sel endotel, induksi respon inflamasi, dan akumulasi platelet setelah terjadi jejas pembuluh darah. Selain itu data penelitian juga menunjukkan bahwa platelet teraktivasi yang berikatan dengan sel endotel melalui LOX-1 yang terkspresi pada permukaan sel endotel berperan dalam peningkatan ekspresi molekul *adhesin* oleh sel endotel, penurunan regenerasi sel endotel, dan induksi pembentukan sel busa. Hal ini mengungkapkan peran ikatan ox-LDL dan LOX-1 pada platelet dalam aterosklerosis (Xu, *et al.*, 2013; Pirillo, *et al.*, 2013).

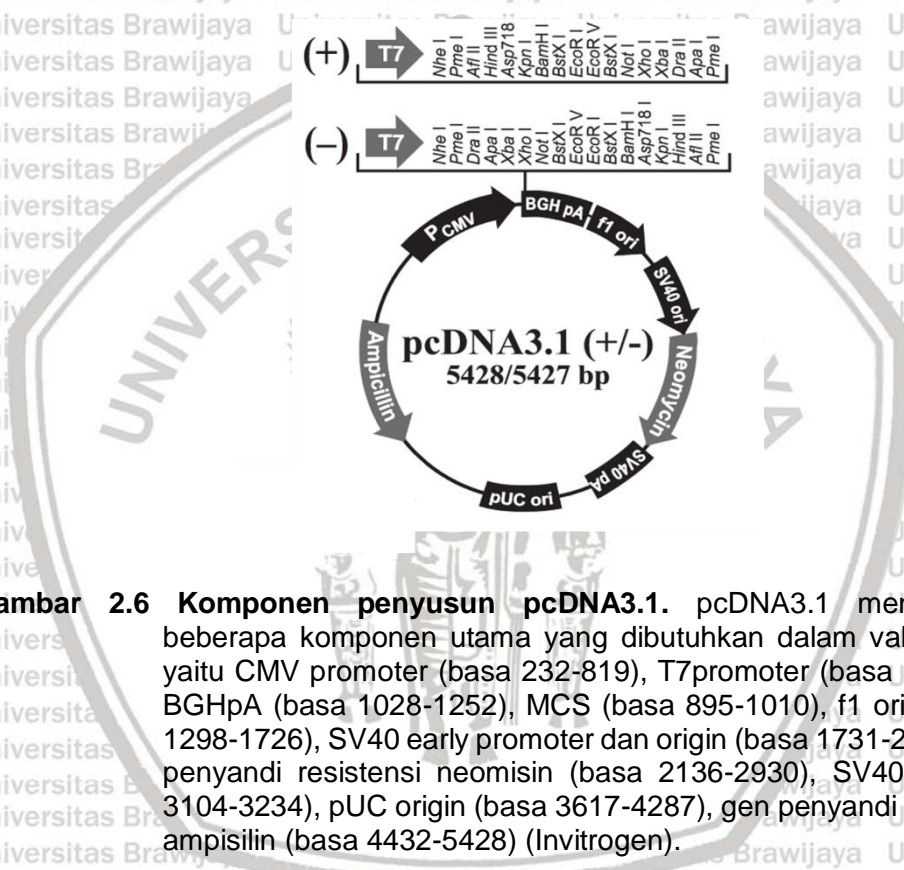
2.3. Vaksin DNA

2.3.1. Komponen Utama Penyusun Vaksin DNA

Vaksin DNA terdiri dari dua bagian utama. Bagian pertama adalah *mammalian expression cassette* (EC) yang terdiri dari promoter mamalia atau sekuen viral *enhancer* / promoter virus untuk ekspresi gen, 5' *untranslated daerah* (5'UTR) termasuk intron, reporter gen atau sekuen poliadenilisasi (poliA). Bagian kedua adalah *bacterial backbone* (BB), yang terdiri dari *bacterial origin of replication* (ori) dan gen resistensi antibiotik atau marker seleksi lain. Idealnya diantara bagian pertama dan bagian kedua terdapat *multiple cloning site* (MCS) atau sisi tempat menyisipkan gen target (Gill, *et al.*, 2009).

Komponen-komponen tersebut mutlak diperlukan dalam suatu vaksin DNA karena perannya yang krusial. Komponen dalam EC mamalia perlu dioptimalkan untuk menghasilkan vaksin DNA yang mampu mengekspresikan gen antigen dengan kadar yang tinggi sehingga dapat menimbulkan respon imun yang diharapkan. Sedangkan komponen BB juga perlu dioptimalkan agar plasmid DNA dapat diproduksi dalam skala besar pada bakteri inangnya (Williams, *et al.*, 2009).

pcDNA3.1 merupakan salah satu plasmid yang sesuai untuk digunakan sebagai pembawa gen antigen pada vaksin DNA karena memiliki komponen yang dibutuhkan dalam vaksin DNA. Beberapa komponen penting yang dimiliki pcDNA3.1 yang berguna sebagai pembawa gen antigen adalah promoter yang dikenali sel mamalia (promoter CMV), situs poliadenilisasi (BGHpA), ori (pUC ori), gen marker seleksi (gen penyandi resistensi antibiotik ampisilin dan neomisin), dan MCS (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Komponen penyusun pcDNA3.1. pcDNA3.1 mengandung beberapa komponen utama yang dibutuhkan dalam vaksin DNA yaitu CMV promoter (basa 232-819), T7promoter (basa 863-882), BGHpA (basa 1028-1252), MCS (basa 895-1010), f1 origin (basa 1298-1726), SV40 early promoter dan origin (basa 1731-2074), gen penyandi resistensi neomisin (basa 2136-2930), SV40pA (basa 3104-3234), pUC origin (basa 3617-4287), gen penyandi resistensi ampisilin (basa 4432-5428) (Invitrogen).

2.3.2 Mekanisme aksi vaksin DNA

2.3.2.1. Mekanisme aksi vaksin DNA dalam memicu presentasi antigen

Setelah vaksin DNA masuk ke dalam sel, antigen diekspresikan dalam jumlah yang relatif sedikit, yaitu dalam skala picogram hingga nanogram melalui sistem ekspresi sel inang (manusia). Oleh karena itu antigen tersebut harus dapat

memicu sistem imun, yang diawali dengan presentasi oleh APC. Saat ini telah dipelajari 3 mekanisme pemrosesan dan presentasi antigen vaksin DNA oleh sel, yaitu pertama, *priming* sel somatik (keratinosit dan miosit), kedua, transfeksi secara langsung oleh APC, dan ketiga, *cross-priming* (Gurunathan, *et al.*, 2000). Mekanisme yang pertama, yaitu sel somatik berperan secara langsung sebagai APC tidak didukung bukti penelitian yang kuat. Meskipun vaksin DNA secara umum diadministrasikan melalui injeksi intramuskuler secara langsung sehingga DNA masuk ke dalam sel otot polos, tetapi sel otot polos tidak dapat mempresentasikan antigen melalui jalur MHC kelas I dengan baik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa meskipun sel otot polos berperan dalam induksi sistem imun, tetapi mekanismenya harus didukung oleh sel lain, dalam hal ini APC profesional. Selain injeksi intramuskuler, vaksin DNA juga diadministrasikan melalui sub-kutan dan ditujukan pada sel keratinosit. Meskipun penelitian menunjukkan bahwa keberadaan sel keratinosit mutlak dalam induksi sistem imun, tetapi sel keratinosit juga tidak dapat mempresentasikan antigen dengan baik secara tunggal (Gurunathan, *et al.*, 2000; Li, *et al.*, 2012).

Mekanisme yang kedua berasumsi bahwa DNA yang diinjeksi secara langsung mengalami transfeksi atau masuk ke dalam sel APC profesional, misalnya sel dendritik. Penelitian menunjukkan bahwa vaksin DNA yang mengalami transfeksi ke dalam sel dendritik hanya sejumlah kecil, namun memiliki peran penting dalam proses presentasi antigen (Gurunathan, *et al.*, 2000; Li, *et al.*, 2012).

Mekanisme ketiga yaitu *cross-priming*, di mana vaksin DNA akan mengalami transfeksi ke dalam sel somatik yang kemudian akan difagositosis oleh APC yang kemudian akan memproses dan mempresentasikan antigen.

Mekanisme ketiga ini dianggap sebagai mekanisme yang paling dapat menjelaskan bagaimana antigen dari vaksin DNA dapat menginisiasi sistem imun (Gurunathan, *et al.*, 2000; Li, *et al.*, 2012).

2.3.2.2. Mekanisme DNA sensing intraselular

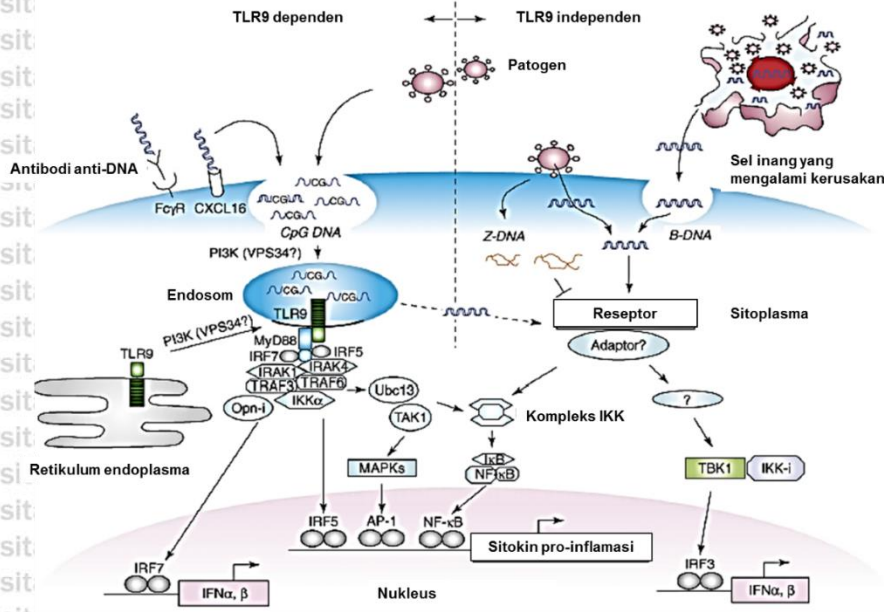
Aktivasi sistem imun oleh DNA diawali dengan induksi produksi interferon dan atau sitokin. DNA mampu menginduksi produksi interferon pada sel dendritik, makrofag, dan fibroblas. Aktivasi sistem imun diawali dengan masuknya DNA untai ganda ke dalam sitosol sel melalui reseptor Fc IIa atau *scavenger receptor*, misalnya CXCL16 (Ishii & Akira, 2006).

Di dalam sel, DNA akan ditangkap oleh beberapa reseptor lain, misalnya DLM-1/ZBP-1 (atau disebut juga *DNA-dependent activator/ DAI*), *Toll Like Receptor 9* (TLR 9) yang ada di permukaan endosom (Ishii & Akira, 2006), *AIM2-like receptor* IFI16, atau *helicase* DDX41 (Unterholzner, 2013). TLR 9 yang diekspresikan pada sel dendritik dan sel B merupakan satu-satunya reseptor DNA bakteri dan nukleotida sintetik dengan motif CpG yang dapat meningkatkan respon imun (Coban, *et al.*, 2008). TLR 9 berinteraksi dengan reseptor permukaan dan protein intraselular lain untuk mengenali dan membedakan DNA asing dari DNA yang ada di dalam sel (Ishii & Akira, 2006).

Vaksin DNA dikenali oleh TLR9 dan MyD88. TLR9 dan Myd88 selanjutnya akan membentuk kompleks bersama dengan IRF5, IRAK4 dan TRAF6. Kompleks ini akan mengaktifasi faktor transkripsi NF- κ B melalui kompleks I κ B kinase dan MAP-kinase melalui Ubc13 dan TAK1. Faktor transkripsi tersebut akan meningkatkan ekspresi sitokin dan *chemokine*. Di samping itu, *toll/IL-1R domain-containing adapter inducing interferon-beta* (TRIF) berperan dalam proses pensinyalan TLR-3 dan TLR-4 yang menginduksi ekspresi gen interferon melalui

TBK1. TBK1 menginduksi IKK- α atau juga dikenal dengan K- α yang selanjutnya akan memfosforilasi IRF3 and IRF7 yang meregulasi ekspresi IFN α dan IFN β (Gambar 2.7) ((Coban, *et al.*, 2008; Ishii & Akira, 2006; Takeshita & Ishii, 2008). Selain itu *stimulator of interferon genes* (STING), yang terlokalisasi di retikulum endoplasma juga diketahui dapat mengaktifasi NF- κ B dan IRF3 yang menstimulasi produksi IFN tipe I setelah mendapatkan rangsangan dari dsDNA (Coban, *et al.*, 2011). Induksi produksi IFN tipe I juga diperantari oleh jalur *TRAF-family-member-associated NFKB activator* (TANK) *binding kinase 1* (TBK-1) - *interferon regulatory faktor 3* (IRF-3).

IFN tipe I (IFN α dan β) ditangkap oleh reseptor IFN α/β yang diekspresikan di permukaan hampir semua jenis sel. Selanjutnya di dalam sel, IFN akan mengaktifasi jalur Janus Kinase (JAK) I dan II serta menginduksi *signal transducer and activator of transcription* (STAT). Kompleks aktivasi ini akan masuk ke dalam nukleus dan menginduksi *IFN-stimulated response elements* (ISREs) yang selanjutnya akan meregulasi transkripsi dari gen yang berperan dalam aktivitas anti-bakteri dan anti-viral. Selain itu, regulasi gen lain yang juga dipengaruhi oleh kompleks ini adalah gen yang berperan dalam produksi pro-inflamasi maupun anti-inflamasi (misalnya interleukin-10) dan apoptosis sel (González-Navajas, *et al.*, 2012). Selain itu, IFN tipe I juga berperan dalam induksi respon T helper 1 (Th1), presentasi antigen menuju sel T CD8+, dan stimulasi proliferasi sel T CD8+. IFN tipe I juga menstimulasi produksi antibodi dan perubahan isotype sel B (Desmet & Ishii, 2012).

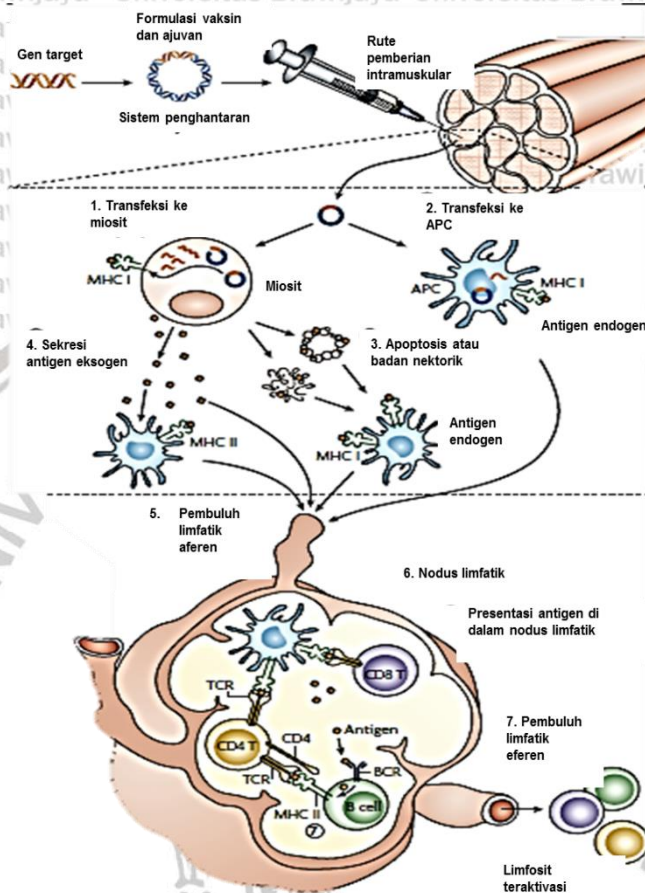


Gambar 2.7 Mekanisme pensinyalan DNA intraseluler (Ishii & Akira, 2006)

2.3.2.3. Mekanisme aksi vaksin DNA dalam memicu sistem imun selular

Gen antigen di dalam plasmid DNA akan diekspresikan menggunakan sistem ekspresi inang (manusia). Selanjutnya antigen ini akan dipresentasikan oleh APC melalui MHC kelas I (jika berupa antigen endogen) atau MHC kelas II (jika berupa antigen eksogen). APC yang mengandung antigen bergerak menuju nodus limfatik melalui pembuluh limfatik aferen. Pada nodus limfa, antigen akan dipresentasikan ke sel T *naive* dan *T cell receptor* (TCR) bersama dengan molekul *co-stimulatory* sehingga terjadi inisiasi respon imun dan ekspansi sel T. Respon sel T berupa aktivasi sel T helper CD4+, sehingga terjadi produksi sitokin yang berperan dalam aktivasi sel B dan sel T sitotoksik. Sel T CD4+ dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel T helper, tergantung pada jenis sitokin, misalnya IL-6 dan IL-21 memicu terbentuknya sel Th17 sementara IL-2 dan IL-4 memicu pembentukan sel Th2. Sel limfosit T sitotoksik (*cytotoxic T lymphocytes*/CTLs) CD8+ akan diaktivasi saat antigen endogen dipresentasikan oleh MHC kelas I. Sel T dapat berdiferensiasi menjadi sel T CD8++ efektor maupun sel T

memori, tergantung pada sitokin yang menginduksinya. Sel T dan sel B yang telah diaktivasi dapat kembali ke sirkulasi melalui pembuluh limfatik eferen dan memberikan pertahanan terhadap antigen (Gambar 2.8) (Desmet & Ishii, 2012; Ishii & Akira, 2006; Kutzler & Weiner, 2008; Liu, 2003).



Gambar 2.8 Mekanisme aksi vaksin DNA dalam menginduksi sistem imun.

Keterangan: gen antigen dalam plasmid DNA akan diekspresikan di dalam sel miosit (1) maupun APC (2) kemudian antigen endogen dipresentasikan oleh MHC kelas I, sementara antigen eksogen akan dipresentasikan oleh MHC kelas II (4). Sel miosit yang mengalami apoptosis (3) juga akan memicu pengeluaran antigen sehingga diprestasikan oleh APC. Selanjutnya APC akan menuju ke nodus limfatik (6) melalui pembuluh limfatik aferen (5), di mana antigen yang dipresentasikan MHC akan dikenali oleh TCR dan mengaktifkan sel T helper CD4 sehingga terjadi produksi sitokin. Antigen juga dapat mengaktifasi sel T sitotoksik (CD8+). Selain itu antigen juga dapat dikenali oleh reseptor sel B sehingga terjadi aktivasi sel B. Sel T dan sel B yang telah diaktivasi (8) akan kembali ke sirkulasi melalui pembuluh limfatik eferen (7) dan memberikan pertahanan terhadap antigen (Kutzler & Weiner, 2008)

CTLs CD8+ yang telah aktif akan bereaksi terhadap antigen di jaringan perifer. CTLs berikatan dengan antigennya melalui ikatan kompleks yang diperantarai oleh reseptor antigen, ko-reseptor (CD8), dan molekul *adhesin* (misalnya ICAM-1). Ikatan ini bersifat sangat spesifik, sehingga hanya mengenali sel yang mengekspresikan antigen target saja. Ikatan terbentuk antara CTLs dan sel target pada daerah yang disebut *synapse*. Selanjutnya CTLs akan mensekresikan protein granul (*granzyme* dan *perforin*) yang menginduksi apoptosis sel target. *Perforin* dapat berpolimerisasi dan membentuk pori pada membran sel target. *Granzyme* memotong substrat-substrat di dalam sel dan menginduksi aktivasi *caspase*. CTLs juga dapat menginduksi apoptosis sel tanpa melalui sekresi granula, tetapi melalui sekresi Fas-ligand (FasL) yang menginduksi apoptosis jalur ekstraselular melalui ikatannya dengan *death receptor* Fas. Setelah menghantarkan granula dan FasL, CTLs akan melepaskan diri dari sel target. CTLs juga mengekspresikan *cathepsin B*, suatu protein yang berperan dalam perlindungan CTLs terhadap *perforin* (Abbas, 2015).

Sel yang mengalami apoptosis akan melepaskan *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) atau *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang akan dikenali oleh *pattern-recognition receptors* (PRR) yang diekspresikan oleh sel dendritik. Selanjutnya akan terjadi mekanisme aktivasi sistem imun kembali, baik aktivasi sistem imun humoral maupun selular (Ishii & Akira, 2006).

2.3.2.4. Mekanisme aksi vaksin DNA dalam memicu sistem imun humoral

Antigen yang diekspresikan sebagai protein ekstraselular dapat ditangkap oleh reseptor sel B yang ada di permukaan sel B. Sel B membutuhkan sel T CD4+ untuk proses aktivasinya. Sel T helper mengekspresikan CD40L yang berperan

dalam sekresi sitokin, misalnya IFN tipe I. Kombinasi antara ikatan CD40L dan IFN tipe I akan menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel B (Desmet & Ishii, 2012).

Dengan bantuan sitokin dan sel *T follicular helper* (T_{FH}) terjadi proses maturasi afinitas sel B di dalam *germinal center* (Desmet & Ishii, 2012). Maturasi afinitas terjadi melalui proses mutasi *somatic* pada IgG rantai berat dan rantai ringan. Hasil dari maturasi afinitas ini adalah sel B yang dapat menghasilkan antibodi dengan afinitas tinggi. Selain itu dengan bantuan sel T helper juga terjadi proses *switching isotype* melalui *switch recombination* yang mengarah pada diproduksinya berbagai isotope Ig. Sel B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma dan sel memori. Sel plasma bermigrasi menuju sumsum tulang belakang sementara sel memori akan bersirkulasi antara nodus limfa dan limpa dan akan memberikan respon yang cepat saat menemui antigen di sirkulasi (Abbas, 2015).

Respon imun humoral terutama diperantarai antibodi yang dihasilkan oleh sel plasma. Reaksi yang diperantarai antibodi diantaranya melalui netralisasi antigen, fasilitasi opsonisasi dan fagositosis antigen, aktivasi komplemen, serta induksi sitotoksik selular. Proses netralisasi toksin dan antigen dilakukan melalui blokade ikatan antigen atau toksin dengan sel. Fasilitasi opsonisasi dilakukan terutama oleh IgG dimana IgG yang telah mengenali antigen akan berikatan dengan Fc reseptor (Fc γ RI) yang ada di permukaan fagosit. Partikel yang mengalami opsonisasi akan terinternalisasi dalam vesikel yang disebut fagosom dan kemudian mengalami fusi dengan lisosom. Selanjutnya akan terjadi degradasi antigen di dalam fagolisosom (Abbas, 2015).

Mekanisme induksi sitotoksik selular diperantarai oleh antibodi yang telah menempel pada permukaan sel patogen, terutama IgG yang membentuk kluster. IgG tersebut akan berikatan dengan reseptor FC γ RIIIA (CD16) yang berada di

permukaan *Natural Killer cells* (NK cells). Ikatan antara IgG dan reseptornya akan mengaktifasi NK cells untuk menghasilkan dan mensekresikan sitokin, misalnya IFN- γ , dan granul-granul yang berperan dalam induksi kematian sel (Abbas, 2015).

Ikatan antigen dengan antibodi juga dapat menginduksi sistem komplemen baik melalui jalur klasik, alternatif, atau lectin. Melalui aktivasi komplemen tersebut akan terjadi respon inflamasi, fagositosis patogen, atau lisis patogen (Abbas, 2015).

2.4. Vaksin subunit oral

2.4.1. Definisi vaksin subunit oral

Vaksin subunit merupakan bentuk vaksin yang paling banyak dikembangkan saat ini. Vaksin subunit rekombinan merupakan vaksin berupa protein antigenik dari patogen tertentu yang dikembangkan melalui teknologi DNA rekayasa genetika. Pada umumnya, vaksin subunit rekombinan diproduksi dengan menggunakan bakteri, kapang (*yeast*), sel serangga, atau sel mamalia sebagai inangnyanya. Sel bakteri merupakan sel yang paling banyak dipilih sebagai inang karena mudah direkayasa dan dapat menghasilkan antigen dalam jumlah tinggi. Walaupun demikian, untuk antigen tertentu yang memerlukan modifikasi paska translasi, lebih dipilih sel eukariota sebagai inangnyanya (Nascimento & Leite, 2012).

Vaksin subunit rekombinan oral merupakan vaksin subunit rekombinan yang diberikan melalui rute oral. Pemberian vaksin melalui rute oral merupakan rute pemberian yang menguntungkan karena penerimaan oleh pasien paling besar, mudah diberikan (tidak membutuhkan ketrampilan khusus), dan tidak invasif. Selain itu, vaksin oral harganya lebih murah karena lebih mudah dalam proses produksinya (tidak membutuhkan teknik aseptik). Pemberian melalui rute oral juga tidak membutuhkan jarum suntik sehingga meminimalkan resiko

kontaminasi bahan biologis berbahaya dan resiko penularan penyakit yang disebarkan melalui darah (*blood-borne infectious disease*) bagi tenaga kesehatan (Ramirez et al, 2017).

2.4.2. Bakteri sebagai pembawa vaksin subunit rekombinan oral

Walaupun vaksin subunit rekombinan oral banyak dikembangkan saat ini karena keunggulan dalam segi keamanan dan biaya produksi yang lebih murah, vaksin subunit rekombinan memiliki kelemahan dalam kemampuan menginduksi sistem imun yang lebih rendah dibandingkan vaksin dari patogen yang dilemahkan. Oleh karena itu, dalam aplikasinya, vaksin subunit rekombinan seringkali dikombinasikan dengan adjuvan atau pembawa lain. Mikroorganisme (bakteri hidup / *live bacterial*) merupakan salah satu pembawa vaksin subunit yang mulai banyak dipilih karena beberapa keunggulan yang dimilikinya.

Penggunaan mikroorganisme sebagai pembawa vaksin mulai dikembangkan karena bakteri hidup memiliki karakteristik khusus, misalnya lipopolisakarida (LPS) pada bakteri Gram negatif, asam lipoteikoat (*lipoteichoic acid/LTA*) pada bakteri Gram positif, atau PAMP yang dikenali oleh *pattern recognition receptor* (PRR) yang dapat memicu sistem imun dengan efektif. Respon imun yang dipicu oleh bakteri hidup yang dilemahkan ini dapat merangsang sistem imun adaptif yang spesifik dan bertahan dalam jangka waktu lama terhadap antigen yang dibawanya sehingga sangat sesuai digunakan sebagai pembawa vaksin (da Silva et al., 2014). Penghantaran vaksin menggunakan bakteri hidup memiliki beberapa keunggulan, diantaranya adalah proses produksi yang sederhana dan murah. Bakteri juga dapat langsung dikenali oleh APC, misalnya sel dendritik / *dendritic cell* (DC). Di dalam DC, bakteri juga berperan sebagai adjuvan karena memiliki PAMP yang menginisiasi sistem imun

bawaan yang akan mengaktifkan sistem imun adaptif (Medina & Guzmán, 2001; da Silva *et al.*, 2014).

Penghantaran menggunakan bakteri hidup pada umumnya diberikan melalui rute oral atau intranasal. Beberapa jenis bakteri yang telah dikembangkan sebagai pembawa vaksin diantaranya adalah *Salmonella typhi* dan *S. typhimurium* (Hegazy & Hensel, 2012), *Listeria monocytogenes* (Shahabi *et al.*, 2010), *Yersinia enterocolitica*, dan *Shigella flexneri* (da Silva *et al.*, 2014).

Lactic acid bacteria (LAB) merupakan golongan bakteri Gram positif yang banyak dikembangkan sebagai pembawa vaksin. LAB merupakan bakteri golongan *Generally Recognize as Safe* (GRAS) yang dianggap aman untuk dikonsumsi. LAB telah banyak digunakan dalam produksi makanan dan minuman. Selain itu bakteri golongan ini juga resisten terhadap kondisi asam di lambung sehingga sesuai untuk diberikan melalui rute oral (Sztraj *et al.*, 2017). Beberapa bakteri LAB yang telah banyak dikembangkan misalnya *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, dan *Lactobacillus plantarum*. Golongan LAB juga diketahui memiliki aktivitas immunomodulator (Wyszyńska *et al.*, 2015).

2.4.3. Mekanisme vaksin subunit rekombinan oral dengan pembawa bakteri dalam memicu sistem imun

Vaksin yang diberikan melalui rute oral dapat mengkativasi berbagai jalur sistem imun, diantaranya sistem imun mukosal melalui produksi sIgA, antibodi IgG serum, dan sistem imun selular. sIgA merupakan antibodi yang bersirkulasi di permukaan lapisan mukosal dan berperan dalam pencegahan perlekatan dan invasi patogen serta netralisasi enterotoksin. IgG serum berperan dalam menangkap patogen invasif, baik yang masuk melalui mukosa atau yang beredar

secara sistemik. Sementara repon sistem imun selular berperan terhadap patogen intraselular (Pasetti *et al.*, 2011).

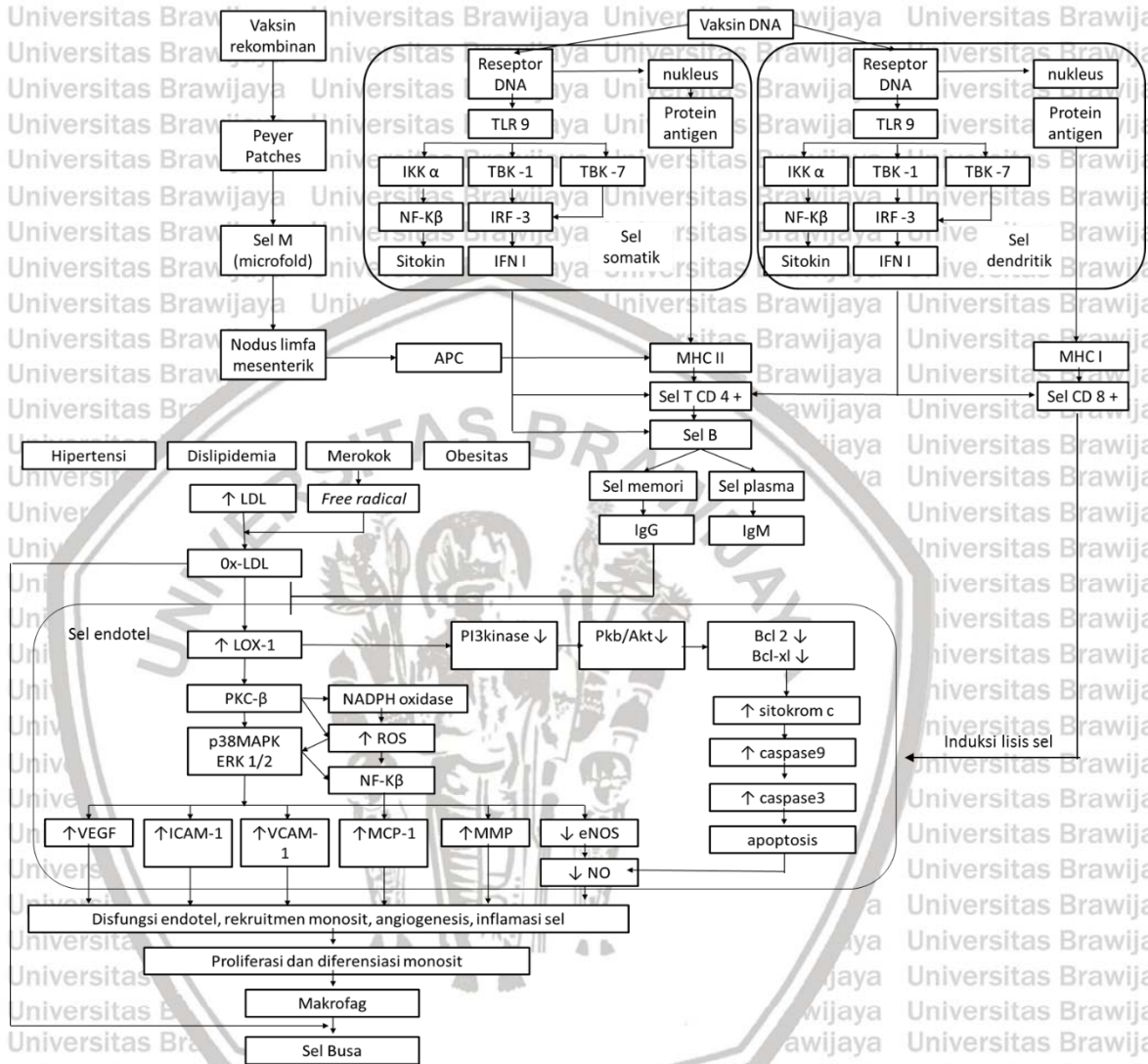
Setelah masuk ke dalam sistem pencernaan bakteri pembawa akan dikenali oleh sistem imun di permukaan saluran cerna, terutama oleh sel *Microfold* (M cells) dan sel dendritik. Di saluran intestinal, sel dendritik memiliki morfologi yang khusus, yaitu memiliki *dentrite transepithelial* yang dapat menembus lumen usus (Pasetti *et al.*, 2011). Antigen akan dibawa menembus barrier epitel intestinal dan dihantarkan menuju APC. Selanjutnya APC yang teraktivasi akan menginduksi sel T CD4+ pada *germinal center* yang terletak di Peyer's Patches dan nodus limfa mesenterik. Sel T CD4+ akan mengaktivasi sel B sehingga terjadi *isotype switching* yang menghasilkan sel B (Ramirez *et al.*, 2017).

Sel B yang dihasilkan dapat berupa sel B plasma yang mensekresikan antibodi (*antibody secreting cells/ ASC*) atau sel B memori. Saat terjadi paparan berulang, sel B memori akan segera berdiferensiasi menjadi sel B plasma yang dapat mensekresikan antibodi, baik berupa sIgA di permukaan mukosa atau IgG di sistemik. sIgA di permukaan mukosa berperan dalam mengenali dan menetralsasi antigen yang masuk melalui rute oral. Sementara sel plasma di limpa atau di sirkulasi berperan dalam menghasilkan IgG yang menetralsasikan patogen yang masuk ke sistem sirkulasi (Pasetti, *et al.*, 2011).

BAB III

KERANGKA KONSEP

3.1. Kerangka Pikir



Hipertensi, dislipidemia, kebiasaan merokok, dan obesitas adalah beberapa faktor resiko aterosklerosis (Libby, 2003). Dislipidemia merupakan salah satu faktor resiko utama aterosklerosis yang ditandai dengan peningkatan kadar kolesterol. Akibat adanya paparan radikal bebas, *shear* stres, dan sitokin pro inflamasi, kolesterol LDL akan berubah menjadi bentuk teroksidasinya yaitu *ox-LDL* (Bonomini, *et al.*, 2008). *Ox-LDL* akan terikat dengan reseptor utamanya, yaitu LOX-1 yang terdapat di permukaan sel endotel. Selanjutnya ikatan antara *ox-LDL* dan LOX-1 akan semakin meningkatkan ekspresi LOX-1 di permukaan endotel sehingga endotel yang teraktivasi akan mengalami ekspresi LOX-1 secara berlebihan di permukaannya (Mango, *et al.*, 2011; Mehta, *et al.*, 2006; Pirillo, *et al.*, 2013).

Ikatan antara *ox-LDL* dengan LOX-1 juga akan memicu proses pensinyalan dalam sel endotel melalui aktivasi PKC- β yang akan menstimulasi aktivasi NADP(H) oksidase dan induksi peningkatan radikal oksigen. Lebih lanjut radikal oksigen ini akan mengaktifasi jalur p38MAPK/ Erk 1/2 dan faktor transkripsi NF- κ B (Li and Mehta, 2009). Aktivasi NF- κ B akan diikuti dengan ekspresi berbagai protein *adhesin*, misalnya ICAM-1, VCAM-1, sitokin (misalnya MCP-1), proteinase (MMP), dan VEGF. Ekspresi protein-protein tersebut akan diikuti dengan terjadinya disfungsi endotel, perekrutan monosit, angiogenesis, dan inflamasi sel (Mollace, *et al.*, 2015; Sugimoto, *et al.*, 2009; Camaré, *et al.*, 2015). Selain itu juga terjadi penurunan kadar eNOS yang mengakibatkan turunnya kandungan NO dalam endotel (Navarra, *et al.*, 2010). Ikatan antar *ox-LDL* dan LOX-1 juga menginduksi terjadinya apoptosis melalui penghambatan PI3 kinase yang selanjutnya menurunkan Bcl2/Bcl-x sehingga terjadi peningkatan sitokrom c serta aktivasi caspase-9 dan caspase-3 (Hong, *et al.*, 2014; Mehta, *et al.*, 2006; Mollace,

et al., 2015). Selanjutnya perekrutan monosit akan diikuti dengan diferensiasi dan proliferasi monosit menjadi makrofag. Ambilan ox-LDL ke dalam makrofag akan menyebabkan terbentuknya sel busa yang merupakan penanda utama aterosklerosis (Pirillo, *et al.*, 2013).

Vaksin DNA yang masuk ke dalam tubuh inang akan ditangkap oleh reseptor DNA pada permukaan sel somatik atau sel dendritik. Selanjutnya di dalam sel somatik dan sel dendritik akan terjadi proses yang sama, yaitu induksi produksi

IFN tipe I dan ekspresi protein antigen yang dikode oleh gen yang disisipkan pada plasmid DNA. Induksi produksi IFN tipe I diawali oleh pengenalan DNA oleh TLR9 yang kemudian diikuti dengan aktivasi TBk-1, TBk-7, dan IKK- α (Babiuk, *et al.*, 2003; Li, *et al.*, 2012; Liu, 2003). IFN tipe I merupakan sitokin yang berperan dalam stimulasi proliferasi dan maturasi sel T dan sel B (González-Navajas, *et al.*, 2012).

Protein antigen yang diekspresikan oleh sel stromal akan dipresentasikan oleh MHC tipe II yang selanjutnya akan mengaktivasi sel T CD4 dan proliferasi sel B.

Lebih lanjut akan terbentuk sel B memori dan sel plasma yang menghasilkan antibodi yang menghalangi ikatan antigen dengan reseptornya (Coban, *et al.*, 2008). Selain itu, antigen yang dipresentasikan oleh MHC tipe I akan memicu sel T sitolitik CD8 yang akan melisiskan sel yang mengandung antigen target (Gurunathan, *et al.*, 2000; Petrovan, *et al.*, 2007; Hauer, *et al.*, 2009).

Dalam penelitian ini, vaksin DNA LOX-1 ditujukan ke sel miosit melalui penghantaran intramuskuler dengan alum sebagai adjuvan. Dengan menggunakan alum sebagai adjuvan, vaksin DNA akan tertahan lebih lama pada tempat pemberian sehingga meningkatkan waktu kontak dengan APC. Lebih lanjut, alum juga berperan dalam stimulasi produksi sitokin dan *chemokine*

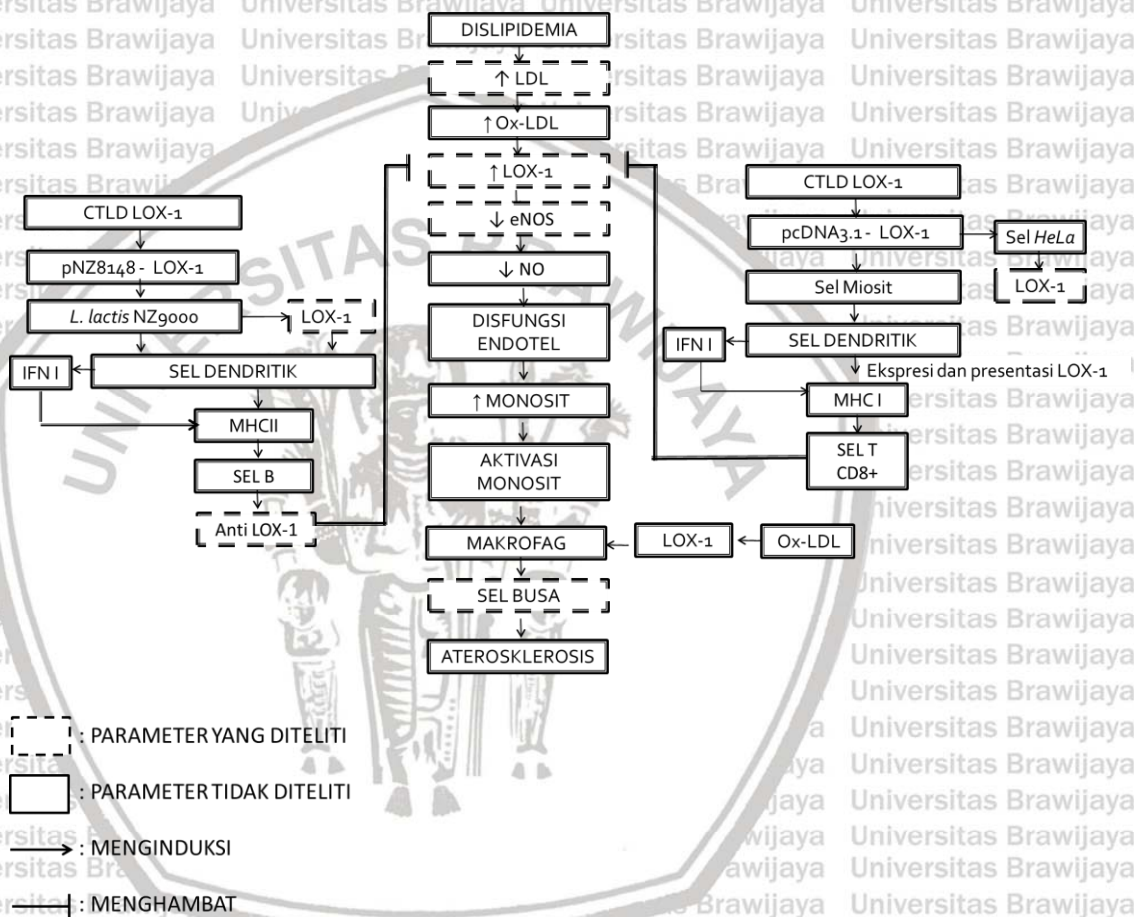
sehingga meningkatkan respon imun (Ghimire, 2015; Hogenesch, 2002; Kool, et al., 2012).

Vaksin DNA LOX-1 terdiri dari plasmid pcDNA3.1 yang mengandung gen *olr1* dan *gfp*. Gen penyandi protein LOX-1 adalah *olr1* yang dalam hal ini dipilih bagian yang mengkode bagian CTLD yang berperan dalam aktivitas pengikatan dengan ligannya (Ohki, et al., 2005; Park, et al., 2005; Tate, 2006). Gen *gfp* merupakan gen penyandi *Green Fluoresens Protein* (GFP) yang digunakan untuk menganalisa ekspresi protein CTLD LOX-1 secara *in vitro* dan *in vivo* (Skelton, et al., 2001). Selanjutnya, gen *olr1-gfp* akan diekspresikan dan dipresentasikan oleh sel dendritik dan sel miosit sebagai protein intraselular karena CTLD LOX-1 tidak mengandung *leader sequence* yang berperan dalam transport protein ekstraselular. Protein CTLD LOX-1 akan dipresentasikan oleh MHC kelas I sehingga mengaktivasi sel T sitolitik CD8+. Sel endotel teraktivasi yang mengekspresikan LOX-1 secara berlebih di permukaannya akan dikenali oleh sel T CD8+ dan dilisikan sehingga tidak terjadi disfungsi endotel yang akan mencegah perkembangan plak aterosklerosis.

Vaksin subunit rekombinan subunit LOX-1 diberikan melalui rute oral dengan menggunakan bakteri *Lactococcus lactis* N9000 sebagai pembawanya. Bakteri yang masuk ke saluran cerna akan ditangkap oleh sel M dan diteruskan ke Peyer Patches dan sel dendritik lainnya (Janeway, et al., 2001). Selanjutnya bakteri akan dilisiskan oleh sel dendritik dan terjadi pelepasan protein subunit LOX-1 yang akan dikenali oleh APC dan dibawa ke nodus limfa mesenterik. Oleh APC subunit LOX-1 dipresentasikan melalui MHC kelas II dan dikenali oleh sel T dan sel B sehingga terjadi induksi produksi antibodi anti-LOX-1. Di dalam darah, anti-LOX-1 akan mengenali LOX-1 dan menghambat ikatan antara ox-LDL dan

LOX-1. Dengan demikian diharapkan disfungsi endotel tidak terjadi. Hambatan disfungsi endotel akan diikuti juga dengan pencegahan penarikan monosit dan makrofag, serta perubahan makrofag menjadi sel busa. Dengan demikian sebagai hasil akhir, diharapkan pembentukan plak aterosklerosis dapat dicegah.

3.2. Kerangka Konsep



Keterangan:

Faktor risiko aterosklerosis, terutama dislipidemia memicu peningkatan LDL kolesterol yang selanjutnya akan mengalami oksidasi menjadi ox-LDL. Pengikatan ox-LDL dengan reseptor utamanya, yaitu LOX-1 akan memicu penurunan NO dan disfungsi endotel. Selanjutnya endotel yang mengalami

disfungsi akan melepaskan molekul *adhesin* dan memicu perekrutan dan aktivasi monosit sehingga terjadi diferensiasi monosit menjadi makrofag. Pengambilan ox-LDL ke dalam makrofag melalui LOX-1 di permukaan makrofag akan mengakibatkan terbentuknya sel busa yang berakibat pada terjadinya aterosklerosis.

Pada penelitian tahap I akan dikembangkan *construct* vaksin DNA LOX-1. *olr1* tikus yang menyandi bagian CTLD LOX-1 dan gen *gfp* yang menyandi GFP akan diligasikan dengan pcDNA3. Gen *olr1-gfp* akan diekspresikan sebagai protein fusi untuk memudahkan analisa ekspresi LOX-1. Plasmid rekombinan yang telah diverifikasi akan ditransfeksikan ke dalam sel HeLa untuk mengetahui keberhasilan ekspresi vaksin DNA LOX-1 dalam sel mamalia.

Selanjutnya vaksin DNA LOX-1 dengan adjuvan alum akan diberikan melalui injeksi intramuskuler kepada hewan coba tikus (*Rattus novvergicus*) strain Wistar. Pada daerah administrasi, alum berperan sebagai sistem *depot* yang akan meningkatkan retensi vaksin DNA LOX-1 dan meningkatkan interaksi dengan APC dan fagositosis. Selain itu, adjuvan alum juga berperan dalam peningkatan pemanggilan APC dan pelepasan sitokin. Plasmid DNA LOX-1 akan masuk ke dalam sel dendritik sekaligus sel miosit dan kemudian protein CTLD-LOX-1 akan diekspresikan di dalam sel. LOX-1 akan diekspresikan dan dipresentasikan oleh sel dendritik melalui MHC kelas I. Sel dendritik yang terstimulasi akan menghasilkan Interferon tipe I yang akan mengaktifasi sel T sitolitik (Tc CD8+). Tc CD8+ akan mengenali LOX-1 di permukaan sel endotel yang mengalami aktivasi dan menginduksi lisisnya sel endotel sehingga tidak terjadi ekspresi LOX-1.

Selanjutnya diharapkan terjadinya penghambatan disfungsi endotel yang ditandai

dengan pencegahan penurunan kadar eNOS dalam sel endotel dan pencegahan pembentukan sel busa di jaringan aorta.

Pada penelitian tahap II, gen CLTD-LOX-1 diligasikan dengan pNZ8148 yang merupakan plasmid ekspresi *Lactococcus lactis* pNZ9000. Plasmid hasil ligasi ditranformasikan ke dalam bakteri pembawa *L. lactis* pNZ9000. Dengan induksi nisin, *L. lactis* mengekspresikan rekombinan CTLD-LOX-1 (subunit LOX-1) secara *in vitro*. Selanjutnya *L. lactis* diberikan melalui rute oral pada hewan coba *spontaneous hypertensive rats - stroke prone* (SHR-SP). Di dalam saluran cerna tikus, *L. lactis* akan dikenali oleh sel dendritik sehingga terjadi lisis sel bakteri disertai dengan pelepasan subunit LOX-1. Proses berikutnya yang terjadi adalah penangkapan subunit LOX-1 oleh APC dan subunit LOX-1 akan dipresentasikan melalui MHC kelas II sehingga terjadi aktivasi sel B dan produksi antibodi anti-LOX-1. Adanya antibodi anti-LOX-1 akan menghambat ikatan antara *ox-LDL* dengan LOX-1 sehingga *ox-LDL* tidak dapat masuk ke dalam sel endotel dan terjadi pencegahan disfungsi endotel. Dengan demikian proses selanjutnya, yaitu sekresi molekul *adhesin*, perekrutan monosit, diferensiasi monosit menjadi makrofag, dan pembentukan sel busa, dapat dihambat.

3.3. Hipotesis penelitian

3.3.1. Hipotesis utama

1. Pemberian vaksin DNA LOX-1 dengan adjuvan alum dapat menghambat disfungsi endotel dan pembentukan sel busa pada jaringan aorta tikus (*R. norvegicus*) Wistar.
2. Pemberian vaksin subunit rekombinan rLOX1 dengan pembawa *L. lactis* NZ9000 dapat menghambat deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan diet tinggi lemak.

3.3.2. Sub Hipotesis Penelitian

1. Vaksin DNA LOX-1 dapat diekspresikan pada sel mamalia (sel Hela).
2. Pembentukan sel busa pada jaringan aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1 dapat dicegah.
3. Ekspresi LOX-1 pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1 dapat diturunkan.
4. Ekspresi eNOS pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1 dapat dicegah penurunannya.
5. LOX-1 rekombinan dapat diproduksi oleh *L. lactis* dengan induksi nisin.
6. Kadar antibodi IgG anti-LOX-1 meningkat pada SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1 dengan pembawa *L. lactis*.
7. Deposisi lipid pada jaringan *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1 dengan pembawa *L. lactis* dapat diturunkan.
8. Kadar lipid serum SHR-SP tidak dipengaruhi oleh vaksinasi subunit LOX-

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Metode Penelitian secara Umum

4.1.1. Penelitian Tahap I

Penelitian tahap I dilakukan untuk membuat *construct* vaksin DNA yang membawa gen *olr1* bagian CTLD dari spesies *Rattus norvegicus* yang digabungkan dengan gen *gfp* yang akan diproduksi pada sel *E.coli* DH5 α dengan plasmid pembawa pcDNA3.1 Gen *gfp* yang menyandi *Green Fluorescence Protein* (GFP) disisipkan untuk mengetahui tingkat ekspresi protein LOX-1 (Snapp, 2010; Soboleski, *et al.*, 2005). Vaksin DNA dikarakterisasi menggunakan analisa restriksi dan analisa urutan gen (sekuensing). Selanjutnya vaksin DNA LOX-1 ditransfeksikan ke dalam sel HeLa menggunakan metode lipotransfeksi (Cui *et al.*, 2012; Tabar *et al.*, 2015). Tingkat ekspresi LOX-1 pada sel HeLa selanjutnya dianalisa menggunakan metode *Real time quantitative Reverse Transcriptase PCR* (*real time RT-PCR*) (Bustin, 2002; Lizee, 2003; Wong & Medrano, 2005). Selain itu ekspresi LOX-1 juga diamati dengan menggunakan mikroskop fluoresens. Ekspresi protein LOX-1 pada sel HeLa dilakukan dengan metode *Western Blot* dengan antibodi anti-LOX-1.

Penelitian tahap I dilanjutkan dengan studi *in vivo* menggunakan tikus (*R. norvegicus*) strain Wistar yang divaksinasi DNA LOX-1 dengan adjuvan alum. Vaksinasi diberikan tiga kali dengan jeda pemberian 4 hari melalui rute intramuskuler (Song *et al.*, 2017). Setelah pemberian vaksin terakhir diet tinggi lemak diberikan selama 8 minggu kemudian tikus dikorbankan.

Kadar kolesterol LDL tikus dihitung sebelum perlakuan dan pada akhir

perlakuan. Ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta ditentukan dengan menggunakan metode *immunofluorescence*. Tingkat disfungsi endotel ditentukan dengan mengukur ekspresi eNOS pada sel endotel aorta menggunakan metode imunohistokimia. Jumlah sel busa pada jaringan aorta ditentukan setelah dilakukan pengecatan preparat jaringan aorta dengan *Haematoxylen Eosin*. Pengolahan dan analisa data dilakukan dengan menggunakan metode ANOVA dan Post-hoc Test.

4.1.2. Penelitian Tahap II

Penelitian tahap II merupakan studi *in vitro* dan *in vivo*. Studi *in vitro* dilakukan untuk membuat *construct* plasmid pNZ8148 sebagai plasmid ekspresi *L. lactis* NZ9000 yang mengandung gen *olr* rat CTLD LOX-1 (pNZLOX-1), gen *gfp* (pNZGFP), dan fusi gen penyandi GFP dan CTLD LOX-1 (pNZGFP-LOX-1). pNZLOX-1, pNZGFP, dan pNZGFP-LOX-1 ditransformasikan pada *L. lactis* NZ9000 dengan menggunakan metode elektroporasi. Selanjutnya bakteri ditumbuhkan pada media seleksi dengan antibiotik kloramfenikol dan klon yang tumbuh diisolasi dan dikarakterisasi plasmidnya. Ekspresi LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1 secara *in vitro* dilakukan dengan induksi nisin. Protein rekombinan subunit LOX-1, rGFP, dan rGFP-LOX-1 dikarakterisasi dengan metode *Western Blot* dengan antibodi anti-his dan pengamatan intensitas *fluorescence*.

Pada studi *in vivo* digunakan hewan coba berupa tikus (*R. norvegicus*) strain *spontaneous-hypertensive rats-stroke prone* (SHR-SP) yang dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Kelompok kontrol menerima vaksinasi 1×10^{10} *colony forming unit* (CFU) *L. lactis* rekombinan yang mengandung pNZGFP dan kelompok perlakuan

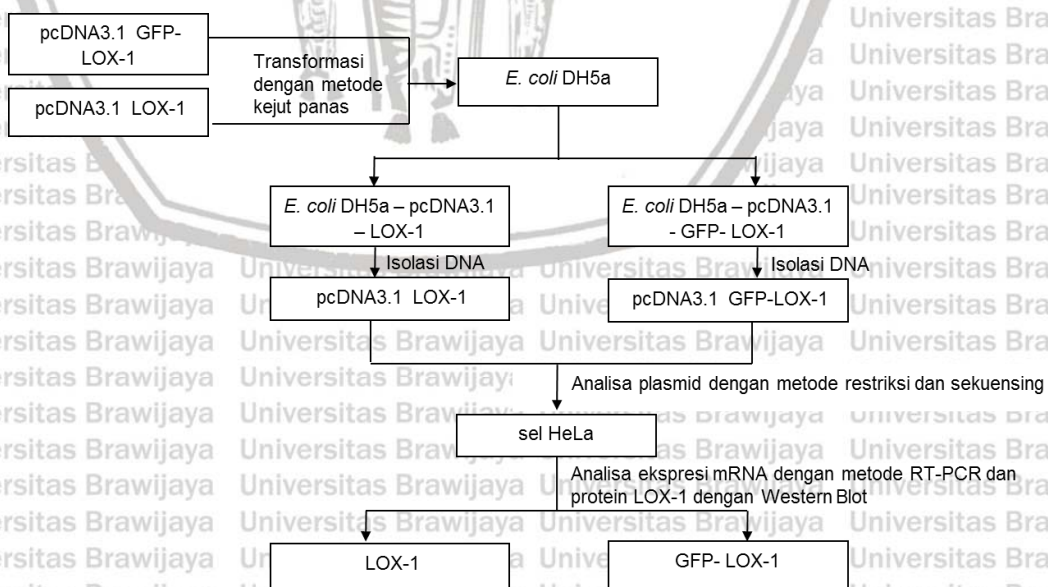
menerima vaksinasi 1×10^{10} CFU *L. lactis* rekombinan yang mengandung pNZGFP-LOX-1. Vaksinasi diberikan tiga kali selama 3 hari berturut-turut, dengan jeda pemberian 2 minggu melalui rute oral. Dua minggu setelah vaksinasi terakhir, diet tinggi lemak diberikan selama 2 minggu kemudian tikus dikorbankan. Pada hari ke-45 setelah vaksinasi pertama dan pada akhir perlakuan, serum darah tikus diambil dan dilakukan penentuan antibodi IgG anti-LOX-1. Profil lipid tikus ditentukan pada akhir perlakuan.

Selanjutnya dilakukan pengambilan jaringan *abdominal mesenteric artery* dan dilakukan penentuan jumlah area deposisi lipid dengan menggunakan pengecatan *Oil Red O*. Pengolahan dan analisa data dilakukan dengan menggunakan *Independent T-Test*.

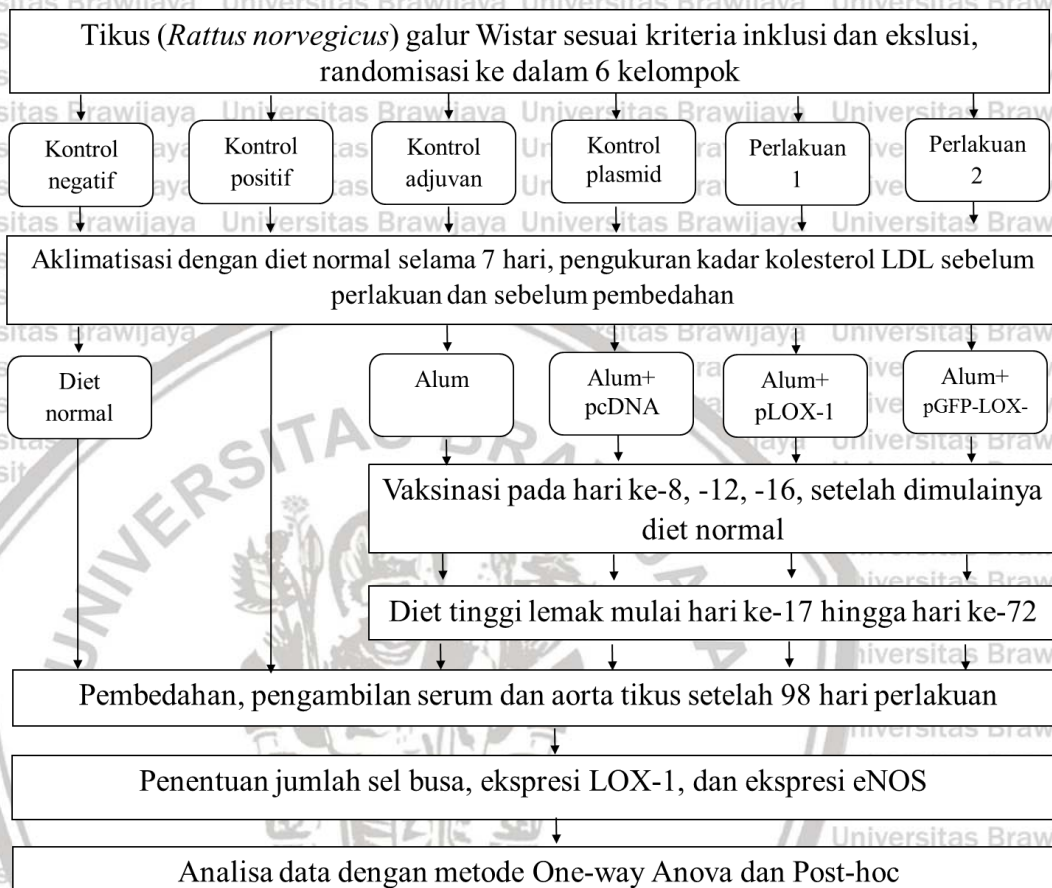
4.2. Diagram Alur Penelitian

4.2.1. Alur Penelitian Tahap I

Construct pLOX-1 dan pGFP-LOX-1

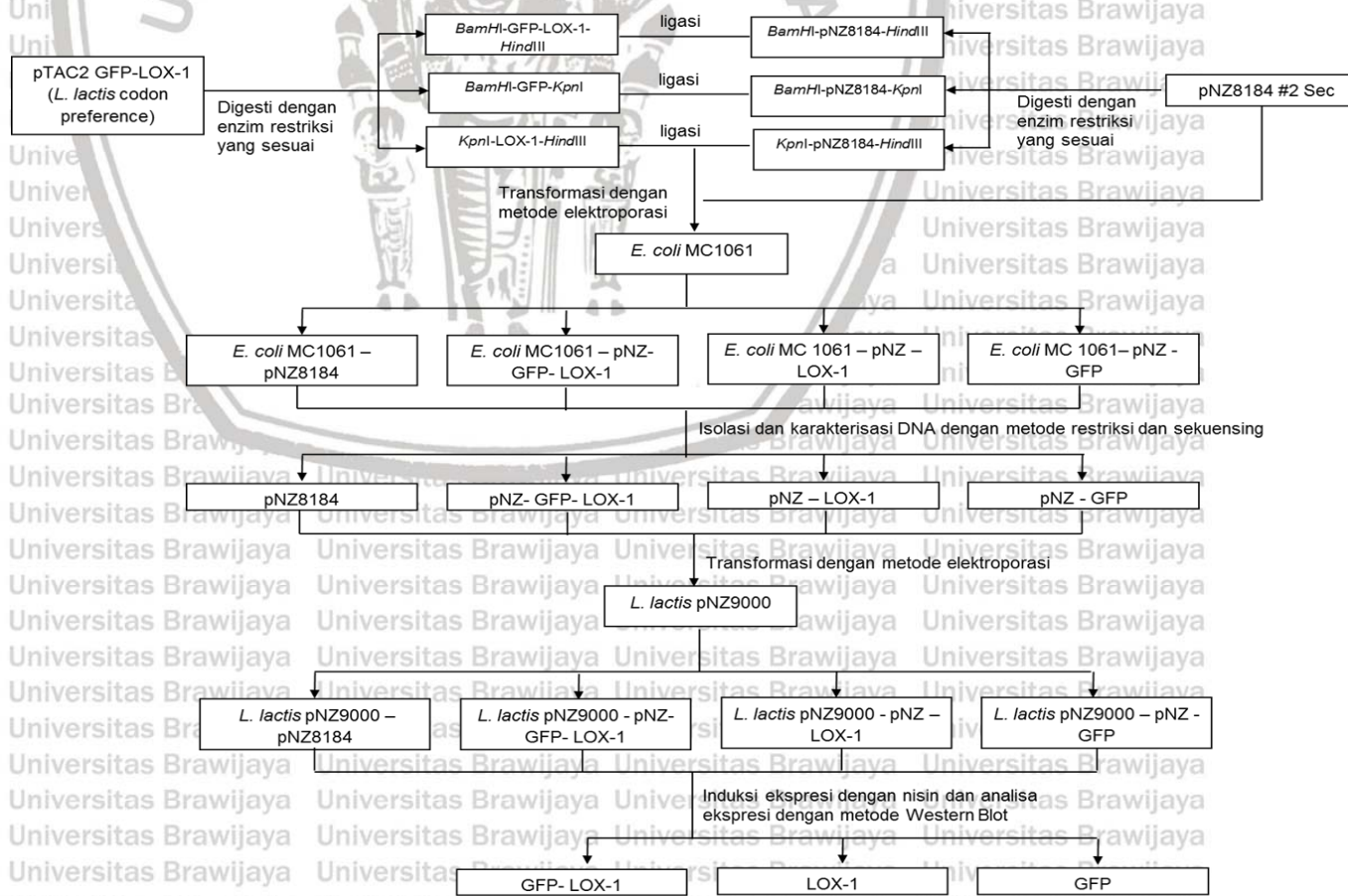


Uji efektivitas vaksin DNA LOX-1 pada tikus Wistar dengan diet tinggi lemak

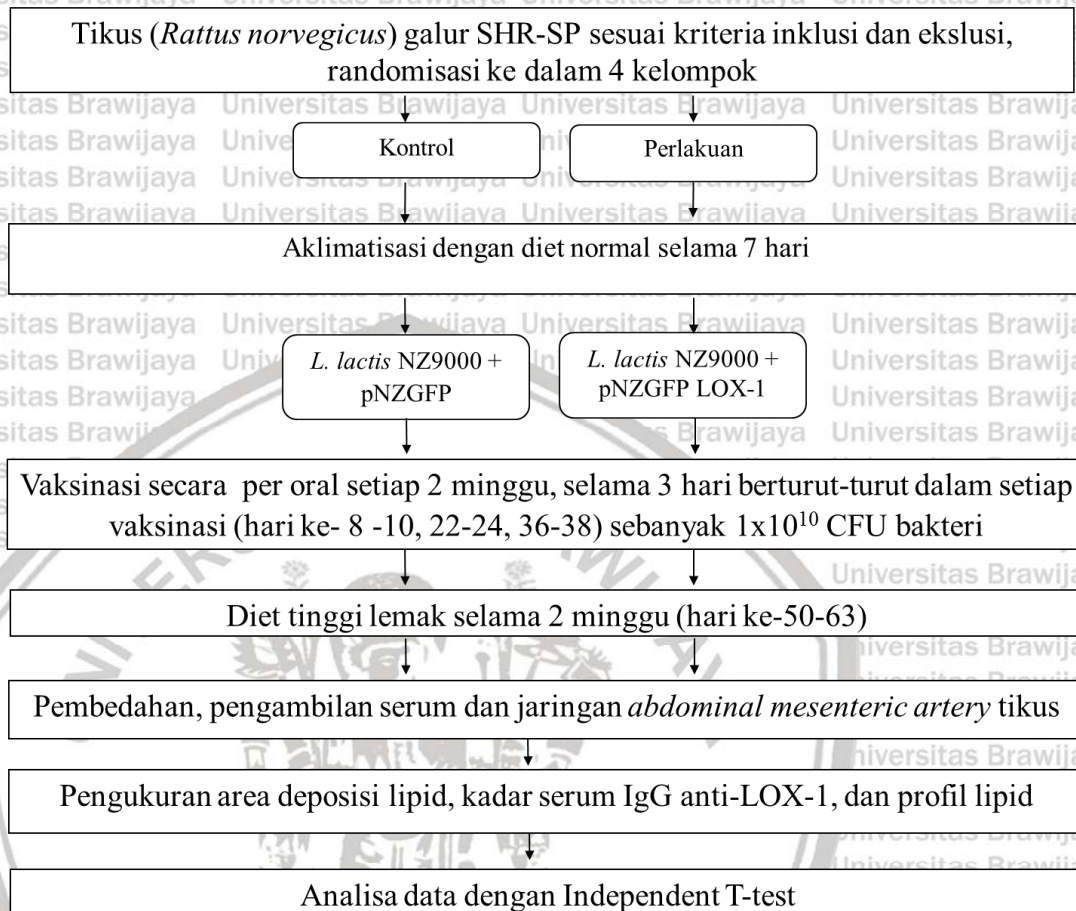


4.4.2. Alur Penelitian Tahap II

Construct pNZLOX-, pNZGFP, dan pNZGFP-LOX-1



Uji efektivitas vaksin subunit LOX-1 pada SHR-SP dengan diet tinggi lemak



BAB V

PENELITIAN TAHAP I

ANALISA POTENSI VAKSIN DNA LOX-1 DALAM MENCEGAH DISFUNGSI ENDOTEL DAN PEMBENTUKAN SEL BUSA PADA JARINGAN AORTA TIKUS WISTAR DENGAN DIET TINGGI LEMAK

5.1. Pendahuluan

5.1.1. Permasalahan

1. Apakah vaksin DNA LOX-1 dapat mengekspresikan CTLD LOX-1 secara *in vitro* pada sel HeLa?
2. Apakah vaksin DNA LOX-1 dapat menurunkan jumlah sel busa pada jaringan aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak?
3. Apakah vaksin DNA LOX-1 dapat menurunkan ekspresi LOX-1 pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak?
4. Apakah vaksin DNA LOX-1 dapat menghambat penurunan ekspresi eNOS pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak?

5.1.2. Tujuan

1. Mengetahui perbedaan ekspresi LOX-1 pada sel HeLa yang ditransfeksi dengan pcDNA-LOX-1 dan sel HeLa yang tidak ditransfeksi.
2. Mengetahui perbedaan jumlah sel busa pada jaringan aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1.
3. Menentukan perbedaan ekspresi LOX-1 pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1.

4. Menentukan perbedaan ekspresi eNOS pada sel endotel aorta tikus

Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin

DNA LOX-1.

5.2. Metode Penelitian

5.2.1 Desain Penelitian

Penelitian tahap I merupakan studi *in vitro* berupa penelitian *true experimental design* yang akan dilakukan pada *E. coli* DH5 α dan sel HeLa serta

studi *in vivo* yang menggunakan desain eksperimen murni rancangan *Randomized*

Post Test Only Controlled Group Design dengan menggunakan hewan coba

berupa tikus (*R. norvegicus*) strain Wistar. Tikus dibagi dalam 6 kelompok, yaitu

kontrol negatif, kontrol positif, kontrol plasmid, kontrol pembawa, perlakuan, dan

perlakuan GFP. Kelompok kontrol negatif menerima diet normal dan tidak

mendapatkan terapi apapun. Kelompok kontrol positif mendapatkan diet tinggi

lemak dan tidak mendapatkan terapi apapun. Kelompok kontrol pembawa

mendapatkan diet tinggi lemak dan alum. Kelompok kontrol plasmid mendapatkan

diet tinggi lemak dan alum + pcDNA3.1 tanpa gen sisipan. Kelompok perlakuan

mendapatkan tinggi lemak dan alum + pcDNA3.1-LOX-1 (selanjutnya disebut

pLOX1). Kelompok perlakuan GFP mendapatkan tinggi lemak dan alum+

pcDNA3.1-GFP-LOX-1 (selanjutnya disebut pGFP-LOX-1). Penelitian ini telah

disetujui oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan No.

248/EC/KEPK/06/2016 (Lampiran 1)

5.2.2. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

5.2.2.1. Lokasi Penelitian

Construct pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 serta analisa ekspresinya pada sel

HeLa dilakukan di Laboratorium Biomedik, FKUB dan Institut Biosains, Universitas

Brawijaya. Pemeliharaan hewan dilakukan di Laboratorium Farmasi, FKUB, sementara pemeriksaan jumlah sel busa, ekspresi LOX-1 dan ekspresi eNOS dilakukan di Laboratorium Biomedik, FKUB.

5.2.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian tahap I dilaksanakan selama 12 bulan, mulai Juli 2016 – Juli 2017.

5.2.3. Populasi dan sampel

5.2.3.1. Batasan Populasi

Populasi dalam penelitian tahap I adalah seluruh tikus (*R. norvegicus*) galur Wistar. Sedangkan sampel adalah tikus putih jantan galur Wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian. Tikus putih galur Wistar dipilih sebagai hewan coba karena dapat menstimulasikan kondisi aterosklerosis melalui pemberian diet tinggi lemak yang dimodifikasi yang diamati melalui peningkatan kadar LDL kolesterol dan pembentukan sel busa, mudah dikembangbiakkan, dan perawatannya yang relatif mudah dan murah.

5.2.3.2. Kriteria sampel

Sampel pada penelitian tahap I adalah yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

- Tikus (*R. norvegicus*) strain Wistar jantan
- Kondisi sehat, ditandai dengan gerak aktif
- Usia 4 minggu
- Bobot 150-250 gram

Kriteria eksklusi:

- pernah digunakan dalam percobaan dengan diet tinggi lemak lainnya

- mengalami kecacatan fisik

5.2.3.3. Besaran sampel

Dalam penelitian ini digunakan enam kelompok hewan coba, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok kontrol adjuvan, kelompok kontrol plasmid, kelompok GFP, dan kelompok perlakuan. Besaran sampel masing-masing kelompok ditentukan berdasarkan rumus Federer sebagai berikut:

$(n-1)(p-1) \geq 15$, dengan n = jumlah pengulangan, p = jumlah kelompok perlakuan.

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$N \geq 4$$

Jadi jumlah hewan coba untuk tiap kelompok minimal adalah 4 ekor, total hewan coba yang dibutuhkan dalam penelitian adalah 24 ekor tikus Wistar.

5.2.3.4. Kelompok penelitian

Kelompok penelitian tahap I terdiri dari 6 (enam) kelompok dengan ketentuan sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif (K-), adalah 4 ekor tikus Wistar jantan yang mendapatkan diet normal tanpa perlakuan.
2. Kelompok kontrol positif (K+), adalah 4 ekor tikus Wistar jantan yang mendapatkan diet tinggi lemak tanpa perlakuan.
3. Kelompok kontrol adjuvan, adalah 4 ekor tikus Wistar jantan yang mendapatkan diet tinggi lemak dengan vaksinasi berupa alum.

4. Kelompok kontrol plasmid, adalah 4 ekor tikus Wistar jantan yang mendapatkan diet tinggi lemak dengan vaksinasi berupa alum+pcDNA3.1 (plasmid kosong).

5. Kelompok perlakuan, adalah 4 ekor tikus Wistar jantan yang mendapatkan diet tinggi lemak dengan vaksinasi berupa alum+pLOX-1.

6. Kelompok GFP, adalah 4 ekor tikus Wistar jantan yang mendapatkan diet tinggi lemak dengan vaksinasi berupa alum+pGFP-LOX-1

5.2.3.5. Prosedur penentuan subyek penelitian

Dalam penelitian tahap I teknik penentuan subyek penelitian yang digunakan adalah *simple random sampling* menggunakan rancangan acak kelompok (RAK), dimana sampel dibagi ke dalam beberapa kelompok secara acak sesuai dan setiap hewan coba memiliki kesempatan yang sama untuk masuk dalam suatu kelompok. Metode yang digunakan adalah sistem *lotree*, sebanyak 2 kali. *Lotree* pertama menentukan kelompok yang akan diambil terlebih dahulu, sedangkan *lotree* kedua untuk mengelompokkan tikus. Dalam menentukan perlakuan mana yang akan diambil terlebih dahulu maka digunakan *lotree* dengan 6 macam kertas, yakni K+, K-, K adjuvan, K plasmid, Perlakuan, dan GFP dimana kertas yang keluar lebih dulu adalah kelompok yang lebih dulu ditentukan anggotanya. Selanjutnya untuk menentukan pengelompokan hewan coba, masing-masing hewan coba diberi nomor 1 - 24 dan dilakukan *lotree* untuk menentukan kelompok dari masing-masing hewan coba dengan melakukan pengambilan nomor *lotree* 4 kali untuk 1 kelompok penelitian. Kertas atau nomor *lotree* yang sudah diambil tidak boleh dimasukkan kembali.

5.2.4. Variable Penelitian

5.2.4.1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksin DNA pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 yang diberikan melalui rute intramuskuler sebanyak tiga kali dengan selang waktu pemberian empat hari.

5.2.4.2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah sel busa pada jaringan aorta, ekspresi LOX-1 pada sel endotel jaringan aorta, ekspresi eNOS pada sel endotel jaringan aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak.

5.2.5. Bahan dan Alat

5.2.5.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian tahap I ini adalah:

1. Bahan untuk menumbuhkan *E. coli* DH5 α : media Luria Bertani agar, media Luria Bertani *broth*, dan *aqua destilata*.
2. Bahan untuk transformasi: gen sintesis *olr1*, pcDNA3.1 (Invitrogen), EcoRV, NheI, CaCl₂, *E. coli* DH5 α .
3. Bahan untuk analisa restriksi: *EcoRV* (Jena Bioscience), *NheI* (Jena Bioscience), agarose, TAE buffer, EtBr, DNA marker, pLOX-1 (GeneScript), pGFP-LOX-1 (GeneScript).
4. Bahan untuk transfeksi pcDNA3.1-LOX-1 dan pcDNA3.1-GFP-LOX-1 pada HeLa: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Fetal Bovine Serum* (FBS), Pen-Strep, *culture flask*, Lipofectamine2000[®] (Invitrogen).
5. Bahan untuk analisa mRNA LOX-1 dan GFP-LOX-1: RNA isolation kit (Jena Bioscience), DNaseI (Promega), *Reverse Transcriptase* kit (Jena

Bioscience), Real Time RT-PCR mix (Kappa Bioscience One Step qRT-

PCR mix), LOX-1 forward primer: 5'

AACTGTTACCTATTTTCCTCGGG 3', LOX-1 reverse primer:

5'ACTGTGCTCTTAGGTTTGCC3', GFP-LOX-1 forward primer:

5'CATGGGCCCTTTAACTGGGA 3', dan GFP-LOX-1 reverse primer:

5' CTCAGGTAGTGGTTGTCGGG 3'.

6. Bahan untuk analisa ekspresi protein LOX-1 dan GFP LOX-1: anti-

LOX-1 (Biorybt), anti-GFP (Biorybt), anti IgG mouse, anti IgG rabbit,

streptavidin-Horse radish peroxidase (SA-HRP), 3,3',5,5'-

tetramethylbenzidine (TMB), susu skim, *Phosphate Buffer Saline*

(PBS), *Phosphate Buffer Saline – Tween20* (PBST), membran

nitroselulosa, protein marker.

7. Bahan untuk preparasi vaksin: pLOX-1, pGFP-LOX-1, alum

($\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \cdot \text{H}_2\text{O}$), PBS, saline (NaCl).

8. Bahan untuk perawatan hewan coba: sekam dan air minum untuk tikus.

9. Bahan untuk pembuatan ransum makanan diet normal dan diet tinggi

lemak:

- Diet normal AIN-93 M :

Diet normal untuk pembuatan 1 kg pakan terdiri dari 70% karbohidrat,

9% lemak, 15% protein dan 3,9 Kkal / gram densitas energi. Untuk

bahan pakan normal dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Bahan Diet Normal untuk 1 kg Pakan

Nama Bahan	g/kg	Nilai Gizi
Tepung jagung	620	KH : 70% total energi
Sukrosa	100	Lemak 9% total energi
Minyak Kedelai	40	Protein 15% total energi
		Densitas energi: 3,9 kkal/g

Gelatin	65
Kasein	80
CMC	50
Mineral dan Vitamin	5 butir

Sumber: (Handayani, *et al.*, 2012; Handayani, *et al.*, 2011)

• Diet tinggi lemak modifikasi AIN-93 M :

Diet tinggi lemak yang digunakan adalah modifikasi diet tinggi lemak AIN-93M (Handayani, *et al.*, 2012; Handayani, *et al.*, 2011) yang ditambahkan dengan asam kolat 0,5 % dan kolesterol 1% serta propil tiourasil 0,5% (Getz, 2005). Diet tinggi lemak untuk pembuatan 1 kg pakan terdiri dari 33% karbohidrat, 50% lemak, 16% protein, dan 4,8 Kkal / gram densitas energi.

Untuk bahan pembuatan diet tinggi lemak dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Bahan Diet Tinggi Lemak untuk 1 kg Pakan

Nama Bahan	g/kg	Nilai Gizi
Tepung jagung	210	
Sukrosa	175	
Minyak kelapa	105	
Korvet	105	KH: 33 % total energy
Minyak Kedelai	50	Lemak: 50 % total energy
Gelatin	50	Protein: 16 % total energy
Kasein	128	Densitas energi: 4,8 kkal/g
CMC	51	
Mineral dan Vitamin	67	

Sumber: (Handayani, *et al.*, 2012; Handayani, *et al.*, 2011)

10. Bahan untuk pengecekan kadar kolesterol LDL: kit pengukuran kadar kolesterol LDL.

11. Bahan untuk pembedahan tikus dan pengambilan jaringan aorta: ketamin, alkohol, kapas, wadah plastik.

12. Bahan untuk pengukuran jumlah sel busa: jaringan aorta, formalin, parafin, xilen, alkohol, aqua destilata, *Harris Haematoxylen*, *Eosin*, *Oil Red O*, *coverslip*.

13. Bahan untuk pengukuran ekspresi LOX-1: jaringan aorta, antibodi primer 1 anti-LOX-1, antibodi sekunder terkonjugasi FITC, xilen, digitonin, etanol 100%, etanol 95%, *mounting medium*, PBS, PBST, BSA, aseton.

14. Bahan untuk pengukuran ekspresi eNOS: jaringan aorta, antibodi primer 1 anti-eNOS, antibodi sekunder, xylene, Triton X, etanol 100%, etanol 95%, *mounting medium*, PBS, PBST, BSA, aseton.

6.2.5.2. Alat

Berikut adalah alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini:

1. Alat untuk menumbuhkan *E.coli* DH5 α : inkubator goyang, oven inkubator, jarum ose, Bunsen, *Laminar Air Flow* (LAF) (ESCO)
2. Alat untuk transformasi: mikropipet, sentrifuga mikro, penangas air
3. Alat untuk analisa migrasi: *horizontal electrophoresis system*, *power supply*, *UV transluminator*.
4. Alat untuk analisa restriksi: inkubator, penangas air, *horizontal electrophoresis system*, *power supply* (Biorad), *gel imaging* (Biorad).
5. Alat untuk transfeksi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 pada sel HeLa: LAF, inkubator, sentrifus (Heraeus), vorteks, mikroskop fluoresen (Olympus)
6. Alat untuk uji ekspresi mRNA LOX-1 dan GFP-LOX-1 pada sel HeLa: LAF, CFX96 Touch™ *Real-Time PCR Detection System* (Biorad)

7. Alat untuk uji ekspresi protein LOX-1 dan GFP-LOX-1: *vertical electrophoresis system* (Biorad), gel imaging, *Trans Blot Semi Dry Transfer Cell* (Biorad), *shaker*.
8. Alat untuk perawatan hewan coba: kandang plastik standar perawatan yang telah dilengkapi oleh botol minum dan tempat makanan, timbangan analitik, gloves, dan pembersih kandang.
9. Alat untuk pembedahan tikus : papan parafin, gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set.
10. Alat untuk pembuatan preparat: penangas air, parafin blok, gelas obyek.
11. Alat untuk penghitungan jumlah sel busa: Mikroskop cahaya (Olympus), *cell counter*.
12. Alat untuk pengukuran ekspresi LOX-1: mikroskop fluoresen (Olympus).
13. Alat untuk pengukuran ekspresi eNOS: mikroskop cahaya (Olympus).

5.2.6. Definisi operasional

- **pLOX-1**: merupakan plasmid pcDNA3.1 yang telah disisipi dengan gen target CTLD LOX-1 yang diproduksi pada *E. coli* DH5 α . Gen pengkode rat CTLD LOX-1 diambil dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dengan nomor referensi BC097290.1. Gen pengkode CTLD LOX-1 disintesis secara kimia (GenScript, New Jersey, USA).
- **pGFP-LOX-1**: merupakan plasmid pcDNA3.1 yang telah disisipi dengan gen target CTLD LOX-1 yang difusikan dengan gen

penyandi eGFP (*Green Fluoresens Protein*) yang diekspresikan pada *E. coli* DH5 α . Gen penyandi eGFP diambil dari NCBI dengan nomor referensi LC336974.1. dan disintesis secara kimia (GenScript, New Jersey, USA)

- ***E. coli* DH5 α** : merupakan strain *E. coli* rekombinan non patogen yang digunakan untuk kloning gen, merupakan bakteri Gram negatif berbentuk basil dengan waktu duplikasi sekitar 30 menit, bersifat aerobik, dan dapat ditumbuhkan pada media Luria Bertani. *E. coli* DH5 α diperoleh dari Widodo Ph.D., Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

- **HeLa**: *cell line* yang berasal dari jaringan kanker serviks dan digunakan untuk menguji ekspresi protein di bawah promotor CMV.

- **Ekspresi LOX-1**: merupakan banyaknya LOX-1 yang diproduksi oleh sel mamalia HeLa yang telah ditransfeksikan dengan pLOX-1 menggunakan metode lipotransfeksi yang dideteksi dengan metode *real time* RT-PCR untuk mengukur kadar mRNA CTLD LOX-1 dan *Western blot* untuk menentukan ekspresi protein LOX-1 dan GFP-LOX-1. Deteksi ekspresi *transient* juga dilakukan dengan melihat pendaran fluoresen protein CTLD LOX-1 yang telah difusikan dengan GFP.

- **Tikus model aterosklerosis**: merupakan tikus strain Wistar dengan diet tinggi lemak yang menunjukkan perubahan morfologi sel endotel yang mengarah pada pembentukan sel busa dan lesi aterosklerotik tahap awal.

- **Diet tinggi lemak**: Diet tinggi lemak yang digunakan adalah modifikasi diet tinggi lemak AIN-93M (Handayani, *et al.*, 2011, 2012) yang

ditambahkan dengan asam kolat 0,5 % dan kolesterol 2%. Diet tinggi lemak untuk pembuatan 1 kg pakan terdiri dari 33% karbohidrat, 50% lemak, 16% protein dan 4,8 Kkal / gram densitas energi.

- **Vaksin LOX-1:** merupakan plasmid DNA pcDNA3.1 yang mengandung gen sisipan rat CTLD *olr1*.
- **Sel busa:** merupakan makrofag yang menangkap *ox-LDL* sehingga mengalami diferensiasi. Sel busa merupakan komponen utama pembentuk plak aterosklerosis. Sel busa akan dihitung dari jaringan aorta yang dipotong dan dibuat preparat kemudian diwarnai dengan *Haematoxylen Eosin*. Jumlah sel busa dihitung dari minimal 10 lapang pandang dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.
- **eNOS:** merupakan enzim berperan dalam sintesis NO pada sel endotel vascular. eNOS merupakan parameter kondisi endotel, di mana endotel yang rusak akan mengalami penurunan ekspresi eNOS. Ekspresi eNOS pada sel endotel aorta akan ditentukan menggunakan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi anti-eNOS.
- **Ekspresi LOX-1:** merupakan LOX-1 yang diproduksi oleh sel endotel pada jaringan aorta yang akan ditentukan dengan *immunofluorecense* dengan menggunakan anti-LOX-1.

5.2.7. Prosedur Penelitian Tahap I

5.2.7.1. Construct pLOX-1 dan pGFP-LOX1

Gen *Olr1* penyandi rat CTLD-LOX-1 diambil dari situs NCBI (BC097290.1) (Lampiran 2). Gen *Olr1* penyandi rat CTLD-LOX-1 diambil dari basa nomor 768-1136. pcDNA3.1 yang digunakan sebagai plasmid pembawa tidak mengandung

sekuen Kozak, kodon start, dan kodon stop sehingga perlu ditambahkan sekuen-
sekuen tersebut. Gen *Olr1* disisipkan diantara sisi restriksi NheI dan EcoRV.

Sekuen gen sisipan disintesis secara kimia (GeneScript). Gen penyandi eGFP diambil dari situs NCBI dengan nomor referensi BC097290.1 (Lampiran 3). Gen penyandi eGFP difusikan dengan gen penyandi CTLD LOX-1 dengan tambahan 6 basa penghubung diantara kedua sekuen.

5.2.7.2. Transformasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1

Transformasi dilakukan dengan metode kejut panas (*heat shock*). Biakan *E. coli* DH5 α dari stok gliserol digoreskan pada agar Luria Bertani (LB) menggunakan jarum ose kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Biakan *E. coli* DH5 α dipindahkan ke dalam 10 mL media LB *broth* dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama semalam (16-18 jam) pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm. Suspensi bakteri yang telah tumbuh diambil sebanyak 0,5 mL dan diresuspensi ke dalam media LB cair sebanyak 10 mL. Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C, 150 rpm hingga mencapai kekeruhan optis (*optical density/OD*) 0,3 - 0,4 pada panjang gelombang 600 nm. Biakan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL kemudian disentrifugasi pada 7500 rpm, 5 menit. *Pellet* sel dicuci dengan larutan CaCl₂ 0,1 M steril dingin sebanyak 0,5 mL dan disentrifugasi pada 7500 rpm selama 5 menit. *Pellet* sel diresuspensi dengan kalsium klorida 0,1 M steril dingin sebanyak 50 μ L lalu diinkubasi selama 2 jam dalam es. Sebanyak 300 ng plasmid dimasukkan ke dalam 50 μ L sel kompeten. Campuran plasmid dan sel kompeten diinkubasi selama 30 menit di es. Dilakukan *heat shock* pada suhu 42°C selama 90 detik pada campuran sel kompeten dan plasmid. Campuran diinkubasi kembali dalam es selama 5 menit. Media LB cair sebanyak 450 μ L ditambahkan pada campuran plasmid dan sel kompeten kemudian sel diinkubasi

lagi selama 1,5 jam pada 37°C, 150 rpm. Sel disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm, 2 menit, diambil 400 mL supernatan sehingga diperoleh larutan pekat sebanyak 100 mL. Larutan tersebut dihomogenkan dengan pipet kemudian disebar pada media LB padat yang mengandung ampisilin 100 µg/mL. Sebagai kontrol negatif digunakan *E. coli* DH5α yang tidak mengandung plasmid yang disebar pada media LB padat yang telah ditambah ampisilin 100 µg/mL. Sel yang telah disebar pada cawan Petri diinkubasi semalam pada suhu 37°C.

Transforman diseleksi dengan ampisilin. *E. coli* DH5α yang telah ditambahkan plasmid dapat tumbuh pada media yang mengandung ampisilin sementara *E. coli* DH5α yang tidak mengandung plasmid tidak dapat tumbuh pada media yang mengandung ampisilin. Koloni yang tumbuh setelah inkubasi semalam dipindahkan ke media baru kemudian dilakukan inkubasi kembali pada suhu 37°C selama semalam (*replica plating*).

5.2.7.3. Isolasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 dengan menggunakan DNA Isolation kit (Jena Bioscience)

Biakan *E. coli* DH5α ditumbuhkan kembali pada 5 mL media LB *Broth* yang mengandung 100µg/mL ampisilin selama semalam pada suhu 37°C, 150 rpm. Keesokan harinya, biakan *E. coli* DH5α disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm, 2 menit, 4°C. *Pellet* sel diresuspensi dengan 250 µL buffer P1. Ditambahkan 250 µL buffer P2 kemudian dilakukan homogenisasi dengan membolak balik tabung 4-6 kali. Ditambahkan 350 µL buffer N3 kemudian dilakukan homogenisasi dengan membolak balik tabung 4-6 kali. Dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm, 10 menit. Diambil 600 µL supernatan dan dipindahkan pada mikrokolom.

Kolom disentrifugasi 30-60 detik. Euan pada bagian penampung dibuang. Kolom dicuci dengan menambahkan 0,5 mL buffer PB dan disentrifugasi kembali 30-60

detik. Eluen pada bagian penampung dibuang. Ditambahkan 0,75 μL buffer PE dan disentrifugasi kembali selama 30-60 detik. Eluen pada bagian penampung dibuang kemudian disentrifugasi kembali 1 menit pada kecepatan maksimal. Mikrokolom dipindahkan pada tabung mikro 1,5 mL yang baru. Ditambahkan 50 μL Buffer EB atau aqua destilata pada titik pusat kolom kemudian didiamkan 1 menit. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan maksimal 1 menit. Konsentrasi DNA hasil isolasi ditentukan dengan menggunakan UV spektrofotometer pada panjang gelombang maksimal 260nm (NanoDrop). Kemurnian DNA hasil isolasi ditentukan dengan melihat perbandingan nilai absorban pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Plasmid hasil elusi disimpan pada suhu -20°C hingga dibutuhkan.

5.2.7.4. Verifikasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 dengan analisa restriksi

pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 direstriksi dengan menggunakan 1 enzim (*NheI*) dan 2 enzim (*NheI* dan *EcoRV*). Restriksi dilakukan dengan mencampur komponen reaksi sebagai berikut:

- Universal buffer (10X) 5 μL
- *NheI* (1 Unit) 1 μL
- *XhoI* (1 Unit) 1 μL
- Plasmid DNA (1 μg) x μL
- H₂O bebas nuclease 43 - x μL

Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Enzim restriksi dideaktivasi dengan menambahkan EDTA 0,5 M. Hasil restriksi dianalisa dengan elektroforesis. Selanjutnya pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 dianalisa dengan sekuenser otomatis (GATC Biotech, Konstanz, Jerman). Hasil sekuensing dianalisa lebih

lanjut dengan program *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) yang diakses pada www.ncbi.nlm.nih.gov.

5.2.7.5. Transfeksi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 ke dalam sel HeLa dengan Lipofectamine 2000® (Invitrogen)

Sel HeLa ditumbuhkan hingga mencapai 80% konfluen dalam *plate* 24 sumuran. Semua prosedur transfeksi dilakukan dalam LAF untuk menjaga kondisi steril. Satu jam sebelum proses transfeksi, media DMEM diambil dari sumuran dan digantikan dengan 300 μ L DMEM tanpa FBS. Disiapkan 2 tabung berlabel A dan B yang masing-masing ditambahkan dengan 25 μ L DMEM tanpa FBS. Pada tabung A dimasukkan 0,5 μ g DNA dan dihomogenisasi. Pada tabung B dimasukkan reagen *lipofectamine transfection*, dengan perbandingan 1 μ L reagen untuk 0,5 μ g DNA. Campuran reagen *lipofectamine* dan DMEM tanpa FBS dihomogenisasi kemudian ditambahkan pada tabung A (campuran DNA - DMEM tanpa FBS) secara perlahan kemudian dihomogenisasi lagi dengan pipet. Campuran diinkubasi selama 20-25 menit pada suhu ruang dalam LAF. Campuran dipindahkan ke dalam sumuran secara perlahan, masing-masing sejumlah 50 μ L per well. *Plate* ditutup kemudian digoyang perlahan dengan tangan. *Plate* diinkubasi selama 3 jam di inkubator 37°C. Setelah 3 jam, media diambil kemudian ditambahkan FBS hingga konsentrasi akhir FBS mencapai 5% dan dilakukan inkubasi lagi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Pengamatan pendaran fluoresens diamati pada jam ke -6,-12,-18, dan -24. Isolasi RNA dan protein dilakukan pada jam ke- 6, -12,-18, dan -24.

5.2.7.6. Isolasi RNA dari kultur sel HeLa dengan RNA Isolation kit (Jena Bioscience)

Sel HeLa sejumlah minimal 10^6 sel diaspirasi medianya kemudian dicuci dengan PBS dingin (1-2 mL). PBS diaspirasi kemudian ditambahkan 1mL Trizol (Abcam) ke dalam *plate*. Trizol dibuang kemudian sel lisat dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL dan didiamkan pada suhu kamar selama 5 menit. Ditambahkan 250 μ L kloroform ke dalam tabung kemudian divorteks 15 detik dan kembali didiamkan pada suhu kamar 5 menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi menunjukkan 3 lapisan, yaitu lapisan atas berupa lapisan *aquaeous* jernih, lapisan tengah berupa DNA terpresipitasi berwarna putih, dan lapisan paling bawah berupa lapisan organik berwarna merah muda. Lapisan *aquaoues* dipindahkan ke tabung mikro lain secara perlahan sehingga tidak menyertakan lapisan DNA. Ke dalam tabung mikro yang berisi lapisan *aquaoues* ditambahkan 550 μ L isopropanol kemudian didiamkan 5 menit pada suhu kamar. Tabung disentrifugasi pada kecepatan maksimal 20 hingga 30 menit. Sampel didiamkan di es kemudian ditambahkan 1 mL etnol 75% dalam air yang sudah dihilangkan RNAsenya dengan dietilpirokarbonat (DEPC). Sampel dihomogenkan kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 9.500 rpm selama 5 menit. Etanol dibuang kemudian *pellet* diangin-anginkan hingga kering. Ditambahkan 15-25 μ L TE buffer yang sudah diperlakukan dengan DEPC atau H₂O pada *pellet* RNA.

Pada sampel RNA hasil isolasi dilakukan penghilangan DNase. DNase *cocktail mix* (Abcam) terdiri dari 1 μ l RQ1 RNase free DNase, 2 μ l DNase 10x *reaction buffer*, 6 μ l DEPC-treated H₂O, dan 0.5 μ l RNase Out. Selanjutnya dicampur 2 μ g RNA dengan air bebas RNase hingga diperoleh volume total 11 μ L.

DNA master mix dicampur dengan RNA sehingga volume total campuran adalah 20 μ L. Selanjutnya sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit kemudian

diikuti dengan inkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit dan sampel disimpan di es. RNA siap digunakan dalam tahap selanjutnya.

5.2.7.7. Analisa ekspresi mRNA LOX-1 pada sel HeLa dengan metode quantitative real time RT-PCR

Dibuat campuran sebagai berikut:

- Master Mix (2X) 10 µL
- Kapa RT Mix (50X) 0,4 µL
- Primer forward (10pMol/µL) 0,4 µL
- Primer reverse (10pMol/µL) 0,4 µL
- H₂O bebas nuclease 8,6 - x µL
- RNA (75 ng) x µL

Ada 2 pasang primer yang digunakan yaitu primer yang mengenali CTLD LOX-1 dan primer yang mengenali GFP-CTLD LOX-1. Urutan primer yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Urutan primer yang digunakan untuk amplifikasi gen LOX-1 dan GFP LOX-1

Primer	Sekuen (5'→3')
Primer CTLD LOX-1 Fwd	AACTGTTACCTATTTTCCTCGGG
Primer CTLD LOX-1 Rev	ACTGTGCTCTTAGGTTTGCC
Primer GFP-LOX-1 Fwd	CATGGGCCCTTTAACTGGGA
Primer GFP LOX-1 Rev	CTCAGGTAGTGGTTGTCGGG

RNA dimasukkan pada tahap terakhir kemudian dilakukan homogenisasi dengan pipet secara perlahan. Sebagai kontrol reaksi digunakan gen β-actin yang diekspresikan secara terus menerus di dalam sel (*house keeping gene*). Reaksi PCR dilakukan dengan kondisi sesuai dengan Tabel 5.4 dengan menggunakan CFX96TM Real Time PCR Detection System (Bio Rad, Hercules, California, USA).

Tabel 5.4 Kondisi Reaksi One-Step RT-PCR

Tahap	Suhu	Waktu	Siklus
Transkripsi balik	42°C	5 menit	1
Denaturasi awal	95°C	3 menit	1
Denaturasi	95°C	20 detik	40
Penempelan	54°C	20 detik	40
Pemanjangan	72°C	45 detik	40
Pemanjangan akhir	72°C	3 menit	1
Penyimpanan	4°C	∞	1

Sebagai kontrol digunakan reaksi tanpa *reverse transcriptase* untuk mendeteksi adanya kontaminan genom. Reaksi dilakukan sebanyak 3 kali. Level ekspresi mRNA ditentukan dengan menggunakan rumus $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dengan $Ct = \text{threshold cycle}$.

5.2.7.8. Analisa ekspresi protein LOX-1 dengan menggunakan metode

Western Blot

Kultur sel HeLa diisolasi protein totalnya pada jam ke -6,-12,-18, dan -24 post-transfeksi dengan menggunakan buffer ekstraksi sitoplasmik yang mengandung HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, Triton-100 1%, dan *protease inhibitors cocktail*. Protein total hasil isolasi dielektroforesis menggunakan SDS-PAGE (*separating gel* 15%, *stacking gel* 4%) kemudian ditransfer ke membran nitroselulosa dengan menggunakan *Trans Blot Semi Dry Transfer Cell*, Biorad selama 2 jam (20V, 300 mA). Membran hasil transfer dicuci dengan *aqua destilata* sebanyak 3x5 menit kemudian dibloking dengan menggunakan susu skim 5% dalam buffer TBS selama semalam, 4 °C. Membran dicuci dengan menggunakan Tris Buffer Saline + Tween 20 0,05% (TBST) selama 3x5 menit kemudian dilakukan inkubasi dengan antibodi primer anti-LOX-1 (Biorybt, Cambridge, UK) dengan konsentrasi 1 µg/mL dan anti-GFP (Biorybt,

Cambridge, UK) dengan konsentrasi 1 : 2000 dalam suhu ruang selama 1 jam.

Membran dicuci dengan menggunakan TBST sebanyak 3x5 menit kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder (anti rabbit IgG dan anti mouse IgG) selama 2 jam pada suhu ruang. Membran kembali dicuci dengan menggunakan TBST kemudian diinkubasi dalam SA-HRP (1:1000) selama 1 jam suhu ruang. Membran dicuci dengan TBST selama 3x5 menit kemudian direndam dalam substrat TMB hingga terbentuk pita. Reaksi warna dihentikan dengan menggunakan *aqua destilata*. Membran dikeringanginkan kemudian diamati pita yang terbentuk.

5.2.7.9. Vaksinasi pLOX-1 dengan adjuvan alum pada hewan coba

Hewan percobaan tikus jantan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 24 ekor dibagi menjadi 6 kelompok penelitian menggunakan metode rancangan acak kelompok dengan jumlah 4 ekor untuk masing-masing kelompok. Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (setiap kandang berisi maksimal 2 ekor tikus). Tikus diaklimatisasi selama 7 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dalam kondisi percobaan. Selama masa aklimatisasi, tikus sudah dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kontrol adjuvan, kontrol plasmid, perlakuan, dan kelompok GFP. Selama masa aklimatisasi dan masa vaksinasi tikus diberikan standar diet normal AIN-93M. Pada saat penelitian berlangsung, minuman diberikan secara *ad libitum*. Sekam diganti setiap 2 hari sekali. Setelah masa vaksinasi, tikus diberi diet yang sesuai dengan kelompoknya. Tikus kelompok K- diberi diet normal AIN-93M. Tikus kelompok K+ diberi diet tinggi lemak tanpa perlakuan lain. Tikus kelompok kontrol alum, kontrol plasmid, perlakuan, dan perlakuan GFP diberi diet tinggi lemak dan vaksin masing-masing. Perlakuan terhadap semua tikus dilakukan secara bersamaan selama 75 hari. Tikus ditimbang berat badannya setiap satu minggu

sekali untuk mengetahui perubahan berat badan tikus. Kadar profil lipid tikus ditentukan sebelum perlakuan dan sebelum tikus dikorbankan. Makanan tikus ditimbang setiap hari untuk mengetahui banyaknya pakan yang dikonsumsi tikus (asupan makanan tikus). Pada akhir penelitian, semua tikus di-eutanasia untuk diambil jaringan aorta sebagai bahan pengecekan ekspresi LOX-1, ekspresi eNOS, dan jumlah sel busa.

5.2.7.9. Preparasi vaksin pLOX-1 dan pGFPLOX-1 dengan menggunakan alum sebagai adjuvan

Plasmid DNA dan alum ($\text{AlK}_2(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,21 M, pH 5) dicampurkan dalam jumlah yang sama (1:1, masing-masing sejumlah 50 μg kemudian diaduk perlahan selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah 2 jam, campuran dicuci 2 kali dengan menggunakan larutan saline steril kemudian diresuspensi dengan PBS steril sebanyak 200 μL .

5.2.7.10. Pemberian vaksin DNA secara intramuskuler dengan menggunakan alum sebagai adjuvan

Suspensi alum dan plasmid diberikan melalui injeksi intramuskuler pada tikus. Vaksinasi diberikan 3 kali dengan jeda pemberian 4 hari. Kelompok kontrol positif dan kontrol negatif tidak mendapatkan vaksinasi, kelompok kontrol adjuvan mendapatkan vaksinasi alum saja, kelompok kontrol plasmid mendapatkan vaksin berupa alum dan plasmid kosong, kelompok perlakuan mendapatkan vaksin alum dan pLOX-1, sementara kelompok GFP mendapatkan vaksinasi alum+pGFP-LOX-1.

5.2.7.11. Pengorbanan hewan coba

Pembedahan diawali dengan pemberian ketamin dosis letal secara intraperitoneal (ketamin 40-100 mg/kg IP dan xylazine 5-13 mg/kg IP). Setelah tikus

tidak sadar, tikus difiksasi dengan jarum di atas papan bedah. Pembedahan dilakukan dengan membuka dinding abdomen dan *thorax*. Jaringan aorta diambil, dibilas dengan dH₂O dan disimpan dalam formalin 10% selama 18-24 jam.

5.2.7.12. Preparasi jaringan aorta untuk pewarnaan

Jaringan aorta yang telah direndam dalam formalin 10% selama 18-24 jam dipotong melintang kemudian dicuci dengan air mengalir 15 menit. Proses *embedding* dilakukan dengan merendam jaringan dalam aseton, xilol, dan parafin cair 55°C. Jaringan aorta ditanam pada parafin blok dan didiamkan sampai membeku selama 24 jam. Jaringan diletakkan dalam balok es kemudian dilakukan penyayatan. Sayatan diletakkan pada penangas air bersuhu 30°C. Sayatan direntangkan pada kaca obyektif dan didiamkan 24 jam. *Slide* dapat digunakan untuk proses selanjutnya.

5.2.7.12. Pewarnaan jaringan aorta dengan *Haematoxylin Eosin* untuk penentuan jumlah sel busa

Slide dideparafinasi dengan dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit kemudian dicuci dengan larutan di bawah ini:

- Xilol (2 x 10 menit)
- Etanol absolut (2 x 10 menit)
- Etanol 90 % (1 x 5 menit)
- Etanol 80 % (1 x 5 menit)
- Etanol 70 % (1 x 5 menit)
- *Aqua destilata* steril (3 x 5 menit)

Slide ditetesi dengan propilen glikol dan didiamkan selama 2 menit kemudian *slide* dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali. *Slide* ditetesi dengan *Haematoxylin Eosin* dan dilakukan inkubasi selama 6 menit. Selanjutnya pada

slide ditambahkan propilen glikol 85% dalam *aqua destilata* dan didiamkan selama 1 menit. *Slide* kembali dicuci dengan *aqua destilata* sebanyak 2 kali kemudian ditambahkan *Haematoxylen* dan dilakukan inkubasi selama 1-2 menit. *Slide* dicuci 2 kali dengan *aqua destilata*. *Slide* ditetesi dengan emelian dan ditutup dengan *coverslip*. Pengamatan *slide* dilakukan menggunakan Mikroskop *Olympus Photo Slide BX51* dengan perbesaran 1000 x untuk perhitungan sel busa. Sel busa dihitung pada minimal sepuluh lapang pandang yang berbeda pada potongan melintang lumen aorta dan diambil reratanya. Analisa histopatologi dilakukan oleh spesialis Patologi Anatomi (Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA dan dr.Kenty Wantri Anita, M.Kes, Sp.PA).

5.2.7.13. Penentuan level ekspresi eNOS di sel endotel aorta dengan imunohistokimia

Slide dideparafinisasi menggunakan xylen selama 2 x 5 menit dan dihidrasi dengan menggunakan 100% etanol selama 2x3 menit dan etanol 95% selama 1 menit. *Slide* dicuci dengan menggunakan *aqua destilata*. Proses fiksasi dilakukan dengan menggunakan aseton selama 1 hingga 10 menit pada suhu ruang. Sampel dicuci dengan PBS suhu dingin dua kali kemudian diinkubasi selama 10 menit menggunakan PSB yang mengandung Triton X-100 0,25%. Sampel dicuci dengan PBS sebanyak 3x 5 menit. Sampel diinkubasi dengan BSA1% dalam PBST selama 30 menit. Diikuti dengan inkubasi dalam campuran dua antibodi primer (anti eNOS) dalam PBST yang mengandung BSA 1% pada *chamber* yang telah dilembabkan selama 1 jam pada suhu ruang atau semalam pada suhu 4°C. Sampel dicuci selama 3x5 menit menggunakan PBS. Ditambahkan antibodi sekunder selama 1 jam pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Antibodi sekunder dibuang kemudian sampel dicuci dengan PBS sebanyak 3 x 5 menit. *Coverslip* di-

mounting dengan menggunakan *mounting* medium. *Slide* yang tidak segera diamati dapat disimpan pada suhu 4°C pada kondisi gelap. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 400x. Analisa ekspresi eNOS dilakukan dengan menggunakan piranti lunak ImageJ dengan cara menentukan % area terwarnai.

5.2.7.14. Penentuan kadar LOX-1 dengan *immunofluorescence*

Slide dideparafinisasi menggunakan xilena selama 2 x 5 menit dan dihidrasi dengan menggunakan 100% etanol selama 2x3 menit dan etanol 95% selama 1 menit. *Slide* dicuci dengan menggunakan *aqua destilata*. Proses fiksasi dilakukan dengan menggunakan aseton selama 1 hingga 10 menit pada suhu ruang. Sampel dicuci dengan PBS suhu dingin dua kali kemudian diinkubasi selama 10 menit menggunakan PSB yang mengandung digitonin 100 µM atau saponin 0,5%. Sampel dicuci dengan PBS sebanyak 3x 5 menit. Sampel diinkubasi dengan BSA 1% dalam PBST selama 30 menit. Diikuti dengan inkubasi dalam antibodi primer anti LOX-1 dalam PBST yang mengandung BSA 1% pada *chamber* yang telah dilembabkan selama 1 jam pada suhu ruang atau semalam pada suhu 4°C. Sampel dicuci selama 3x5 menit menggunakan PBS.

Ditambahkan antibodi sekunder dengan konjugat terkonjugasi FITC selama 1 jam pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Campuran antibodi sekunder dibuang kemudian sampel dicuci dengan PBS sebanyak 3x 5 menit dalam kondisi gelap.

Counter-staining dilakukan dengan menginkubasi sel pada 0,1 – 1 µg/mL DAPI (DNA stain) selama 1 menit dan sampel dicuci dengan PBS. *Coverslip* dimounting dengan menggunakan *mounting* medium. *Slide* yang tidak segera diamati dapat disimpan pada suhu 4°C pada kondisi gelap. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus). Level fluoresensi dianalisa dengan

menggunakan perangkat lunak ImageJ dengan menghitung *Corrected Total Cells Fluorescence* (CTCF) pada *region of interest* (ROI) dengan ukuran yang sama.

CTCF ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$CTCF = \frac{\text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})}{\text{Area of selected cell}}$$

5.2.8. Pengolahan dan analisis data

Hasil pemeriksaan parameter uji kelompok kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program IBM SPSS 20 (*Statistical Package for the Social Sciences*) dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

1. Untuk menguji normalitas distribusi sampel dilakukan uji menggunakan Kolmogorov-Smirnov *test*. Nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan distribusi data yang tidak normal, sedangkan nilai signifikansi $> 0,05$ menunjukkan distribusi data yang normal. Jika distribusi data tidak normal, maka dilakukan transformasi data untuk menormalkan.
2. Untuk menguji homogenitas sampel dilakukan uji kesamaan ragam menggunakan *Levene test homogeneity of variances*. Nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan varian data yang tidak homogen, sedangkan nilai signifikansi $> 0,05$ menunjukkan varian data yang homogen. Jika varian data tidak sama atau tidak homogen, maka dilakukan transformasi data untuk menghomogenkan sehingga didapatkan varian data sama atau homogeny.
3. Uji *One-way ANOVA* atau Kruskal-Wallis digunakan untuk menganalisis apakah terdapat perbedaan hasil yang bermakna antar masing-masing

kelompok penelitian dengan melihat nilai p , dengan nilai $p < 0,05$ menggambarkan adanya perbedaan hasil yang bermakna antar kelompok.

Uji Kruskal-Wallis dipilih jika data tidak terdistribusi normal dan varian tidak homogen.

4. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna, maka dilakukan uji *Post-hoc* dengan *Tukey HSD* untuk data yang menggunakan uji *One-way ANOVA* dan uji *Mann-Whitney* untuk data yang menggunakan uji Kruskal-Wallis. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan kelompok tersebut memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok yang dibandingkan.

5. Analisa survival rate antara kelompok dilakukan dengan menggunakan metode analisa Kaplan-Meier.

Hasil analisa telah dikonsultasikan dengan Achmad Efendi, S.Si., M.Sc., Ph.D. dari Program Studi S1 Statistika, Jurusan Matematika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

5.3. Hasil Penelitian dan Pengolahan Data

5.3.1. Construct pLOX-1 dan pGFP-LOX-1

Construct pLOX-1 dibuat dengan menggabungkan gen penyandi CTLD LOX-1 tikus (GenBank Ref No: BC097290.1) yang ditambahkan dengan sekuen pengenalan enzim restriksi *NheI* (GCTAGC) pada ujung 5' dan sekuen pengenalan enzim restriksi *EcoRV* (GATATC) pada ujung 3'. Selain itu juga ditambahkan sekuen Kozak (ACCATGG) serta kodon start (ATG) dan kodon stop (TGA) karena pada pcDNA3.1 sebagai plasmid pembawa tidak mengandung komponen yang dibutuhkan dalam proses translasi. Sekuen CTLD LOX-1 memiliki panjang 369 pb, sedangkan sekuen tambahan lain (sekuen Kozak, kodon *start*, dan kodon stop) sepanjang 27 pb, sehingga total panjang sekuen DNA yang disisipkan adalah

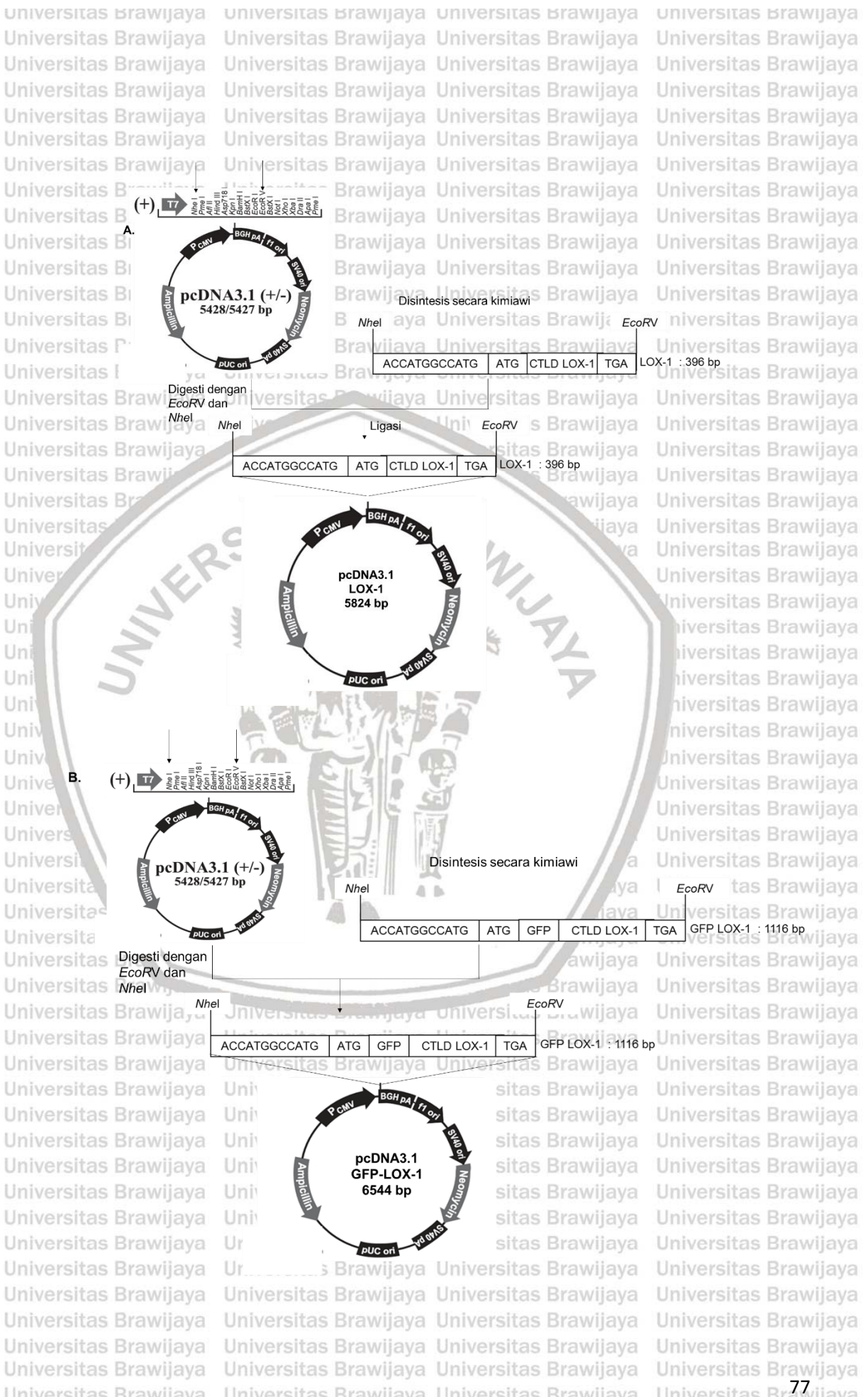
sepanjang 396 pb. *Construct* pGFP-LOX-1 dibuat dengan menggabungkan sekuen penyandi eGFP dan CTLD LOX-1. Sekuen penyandi eGFP diletakkan pada ujung 5' dan sekuen penyandi CTLD LOX-1 pada ujung 3'. Diantara kedua sekuen tersebut ditambahkan 6 basa sebagai penghubung (GGATCC). Sama seperti pada *construct* pLOX-1, pada *construct* pGFP-LOX-1 juga ditambahkan Kozak sekuen, kodon *start*, dan kodon stop. Ukuran total DNA yang disisipkan adalah sepanjang 1116 pb, yang terdiri dari 714 pb penyandi eGFP, 369 pb penyandi LOX-1, dan 27 pb komponen penunjang translasi. Peta hasil *construct* pGFP-LOX-1 dan pLOX-1 dapat dilihat pada Gambar 5.1.

5.3.2. Verifikasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1

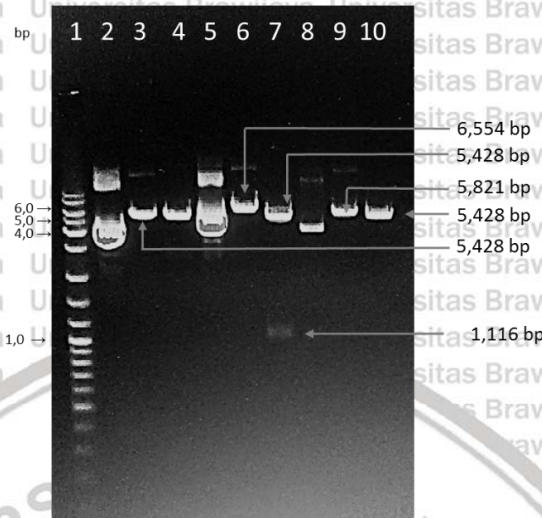
pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 diverifikasi dengan menggunakan metode analisa restriksi dan sekuensing. Analisa restriksi menunjukkan bahwa pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 benar mengandung gen sisipan dengan ukuran yang sesuai (Gambar 5.2). Hasil sekuensing dianalisa lebih lanjut dengan menggunakan program BLAST yang menunjukkan bahwa identitas gen sisipan benar merupakan penyandi gen LOX-1 dan gen penyandi GFP – LOX-1 (Lampiran 4).

5.3.3. Ekspresi LOX-1 dan GFP-LOX-1 pada sel HeLa

pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 dianalisa apakah dapat dikenali oleh sistem ekspresi mamalia, dalam hal ini digunakan sel HeLa sebagai model sel mamalia. Analisa ekspresi dilihat dengan mengamati pendaran yang dihasilkan oleh GFP di bawah sinar fluoresensi. Jumlah plasmid yang ditransfeksikan adalah sebesar 0,5 µg. Pengamatan dilakukan 6, 12, 18, dan 24 jam setelah transfeksi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pendaran GFP paling kuat teramati 18 jam setelah pendaran. Sel HeLa yang ditransfeksi dengan plasmid kosong dan tidak ditransfeksi tidak menunjukkan pendaran (Gambar 5.3).



Gambar 5.1 Peta *construct* pLOX-1 (A) dan pGFP-LOX-1 (B) dengan plasmid pembawa pcDNA3.1(+) (Sumber peta plasmid pcDNA3.1(+): Invitrogen).

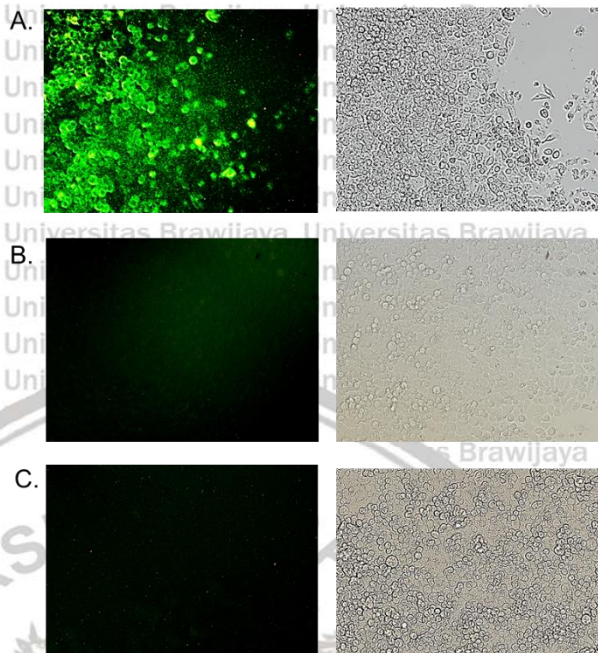


Gambar 5.2. Hasil analisa elektroforesis agarose menunjukkan bahwa pCDNA, pLOX-1, dan pGFP-LOX-1 mengandung gen sisipan dengan ukuran yang sesuai (396 dan 1116 bp). Keterangan: 1. DNA Marker, 2-4 = pCDNA3.1 tidak dipotong, pCDNA3.1 dipotong dengan NheI (5428 bp), pCDNA3.1 dipotong dengan NheI dan EcoRV (5428 bp), 5-7= pGFP-LOX-1 tidak dipotong, pGFP-LOX-1 dipotong dengan NheI (6554 bp), pGFPLOX-1 dipotong dengan NheI dan EcoRV (ada dua pita berukuran yang menunjukkan ukuran vektor 5428 bp dan insert 1116 bp), 8-10= LOX-1 tidak dipotong, LOX-1 dipotong dengan NheI (5821 bp), LOX-1 dipotong dengan NheI dan EcoRV (hanya tampak pita vector berukuran 5428 bp, pita insert berukuran 396 bp tidak terlihat).

Lebih lanjut analisa ekspresi dilakukan pada level mRNA dengan menggunakan qRT-PCR dan pada level protein dengan menggunakan metode *Western Blot*.

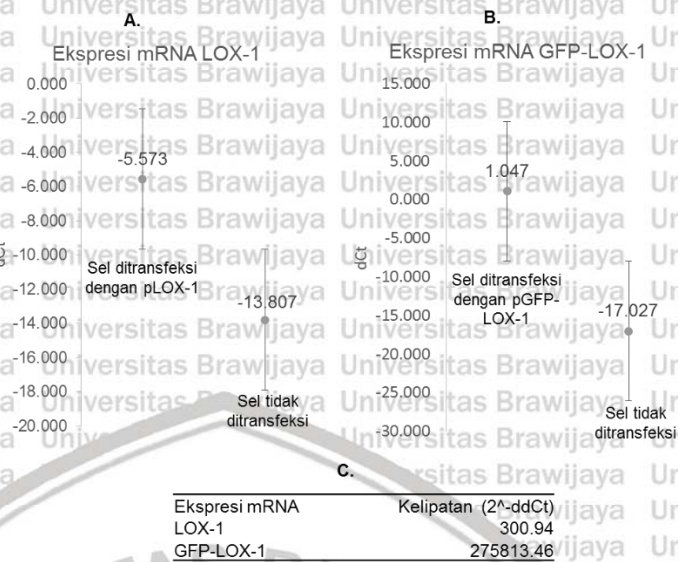
Analisa pada level mRNA menunjukkan bahwa LOX-1 dan GFP-LOX-1 diekspresikan lebih tinggi pada sel yang ditransfeksi daripada pada sel HeLa yang tidak ditransfeksi. Analisa ekspresi mRNA dihitung dengan menggunakan rumus $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dan hasil penentuannya dapat dilihat pada Gambar 5.4.

Mikroskop fluoresensi Mikroskop cahaya

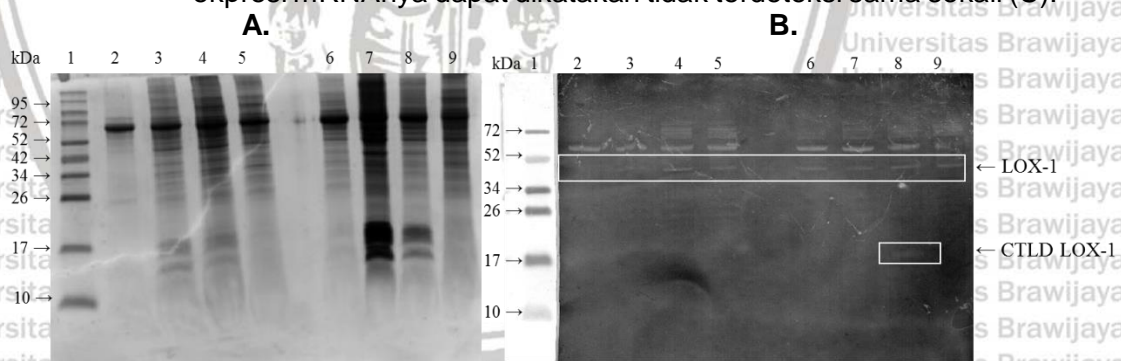


Gambar 5.3 Analisa ekspresi GFP-LOX-1 dengan menggunakan mikroskop fluoresensi. Sel HeLa yang ditransfeksi dengan pGFP-LOX-1 (A) menunjukkan fluoresensi sementara sel HeLa yang ditransfeksi dengan pcDNA3.1 (B) dan sel HeLa yang tidak ditransfeksi (C) tidak menunjukkan pendaran pada pengamatan dengan mikroskop fluoresensi (perbesaran 100x).

Protein intrasel pada kultur HeLa diisolasi pada jam ke -6, -12, -18, dan -24 setelah sel ditransfeksi kemudian protein total dianalisa dengan *Western Blot*. Hasil analisa pada level protein menunjukkan bahwa protein LOX-1 diekspresikan paling banyak pada jam ke-18. Protein LOX-1 terdeteksi pada ukuran 45 kDa yang merupakan ukuran protein LOX-1 matang. LOX-1 terdeteksi pada sel yang ditransfeksi maupun pada sel yang tidak ditransfeksi. Namun, hasil analisa dengan *Western blot* menunjukkan adanya pita spesifik pada ukuran 14 kDa yang hanya tampak pada lisat sel HeLa yang ditransfeksi dengan pLOX-1 yang menunjukkan ekspresi CTLD LOX-1 (Gambar 5.5). Hal ini menunjukkan bahwa pLOX-1 dapat dikenali oleh sistem ekspresi mamalia dan berpotensi sebagai vaksin DNA yang dapat diekspresikan secara *in vivo*.



Gambar 5.4. Hasil analisa ekspresi mRNA pada sel yang ditransfeksi dengan pLOX-1 dan pGFP-LOX1 dibandingkan dengan sel yang tidak ditransfeksi (A, B). Ekspresi mRNA ditentukan dengan rumus $2^{\Delta\Delta Ct}$ dan diperoleh hasil ekspresi mRNA LOX-1 300 kali lebih tinggi pada sel yang ditransfeksi pLOX-1 dibandingkan pada sel yang tidak ditransfeksi, sementara ekspresi mRNA GFP-LOX-1 275.813 kali lebih banyak dibandingkan pada sel yang tidak ditransfeksi. GFP bukan merupakan protein endogen pada HeLa sehingga ekspresi mRNANYa dapat dikatakan tidak terdeteksi sama sekali (C).



Gambar 5.5. Hasil analisa ekspresi protein LOX-1 dengan metode SDS-PAGE (A) dan Western Blot (B). Analisa dengan SDS-PAGE menunjukkan ekstrak protein hasil isolasi dari kultur HeLa yang tidak ditransfeksi (line 2-5) dan ditransfeksi dengan pLOX-1 (line 6-9) pada jam ke -6, -12, -18, dan -24 post-transfeksi. Analisa dengan Western Blot dengan antibodi anti-LOX-1 menunjukkan pita berukuran sekitar 45 kDa pada semua ekstrak protein. Pita berukuran 14 kDa yang menunjukkan CTLD LOX-1 hanya dapat terlihat pada ekstrak sel dari kultur HeLa yang ditransfeksi dengan pLOX-1 yang diisolasi 18 jam setelah transfeksi.

5.3.4. Vaksinasi pLOX-1 dengan adjuvan alum mencegah penurunan ekspresi eNOS

Vaksin DNA LOX-1 diharapkan dapat mencegah disfungsi endotel yang ditentukan melalui analisa ekspresi eNOS. Pada Tabel 5.5 terlihat bahwa ekspresi eNOS pada kelompok kontrol negatif dengan diet normal paling tinggi (38,22%) dibandingkan ekspresi eNOS pada kelompok lain yang menerima diet tinggi lemak.

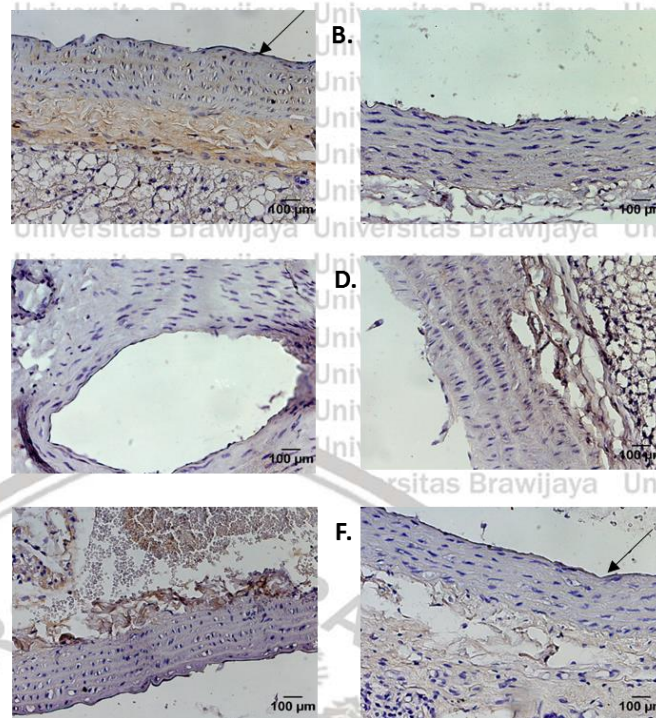
Tabel 5.5. Perbandingan ekspresi eNOS pada jaringan aorta

Kelompok	% area yang mengekspresikan eNOS (SD)	P value
Kontrol -	38,22 (10,60)	
Kontrol +	22,22 (1,20)	0.657
Alum	18,72 (12,33)	0.349
pcDNA	25,89 (7,33)	0.835
pLOX-1	21,92 (3,11)	0.642
pGFP-LOX-1	31,00 (15,54)	0.978

Gambar 5.6 menunjukkan bahwa disfungsi endotel pada kelompok kontrol negatif tidak terjadi, yang ditandai dengan tingginya ekspresi eNOS berupa warna coklat pada sel endotel jaringan aorta (38,22 %). Sebaliknya pada kelompok lain yang menerima diet tinggi lemak terjadi penurunan ekspresi eNOS. Kelompok perlakuan GFP-LOX-1 mengekspresikan eNOS sedikit lebih tinggi (31,00%) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang tidak menerima vaksinasi (22,22%), kelompok kontrol alum (18,72%), dan kelompok kontrol plasmid (25,89%) (Tabel 5.5 dan Lampiran 5) dengan nilai p = 0,419.

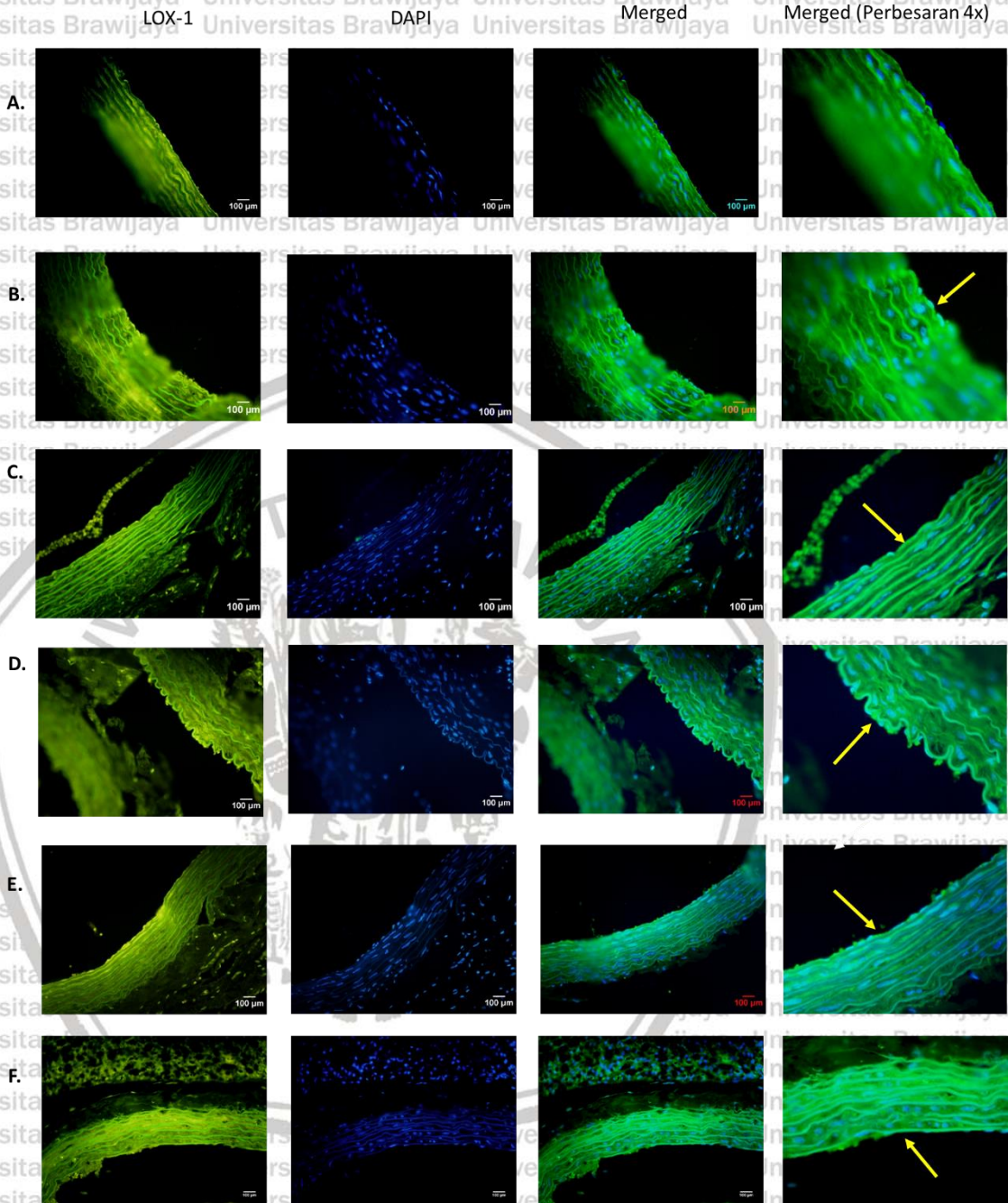
5.3.5 Vaksin DNA LOX-1 menurunkan ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta tikus dengan diet tinggi lemak

Vaksin DNA LOX-1 diharapkan mampu menurunkan ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta tikus dengan diet tinggi lemak. Ekspresi LOX-1 yang dianalisa



Gambar 5.6. Perbandingan ekspresi eNOS pada jaringan aorta. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 400x. Ekspresi eNOS pada sel endotel ditunjukkan dengan warna coklat (tanda panah). Keterangan: A = kelompok kontrol negatif, B = kelompok kontrol positif, C= kelompok kontrol adjuvan (alum), D = kelompok kontrol plasmid (pcDNA), E= kelompok perlakuan (LOX-1), dan F = kelompok perlakuan (GFP-LOX-1).

melalui intensitas fluoresensi CTCF ditampilkan pada Gambar 5.7. Ekspresi LOX-1 pada kelompok kontrol negatif dengan diet normal menunjukkan intensitas yang lebih rendah (199.084,6) dibandingkan dengan intensitas pada kelompok lain yang menerima diet tinggi lemak (Gambar 5.7). Dalam kondisi normal, LOX-1 diekspresikan dalam kadar rendah sehingga level fluoresensi yang terdeteksi juga rendah. Pada kontrol positif dengan diet tinggi lemak, ekspresi LOX-1 tampak dengan intensitas yang lebih tinggi (281.019,3). Kelompok perlakuan pLOX-1 (277.610,6) dan pGFP-LOX-1 (258.528,8) menunjukkan ekspresi LOX-1 yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif (281.019,3), kontrol adjuvan



Gambar 5.7. Perbandingan ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta yang dianalisa dengan metode imunofluoresensi. Tidak ada perbedaan ekspresi LOX-1 (tanda panah) yang berarti antar kelompok. Keterangan: A = tikus kelompok kontrol negatif, B = tikus kelompok kontrol positif, C = tikus kelompok kontrol adjuvan (alum), D = tikus kelompok kontrol plasmid (pcDNA), E = tikus kelompok perlakuan (LOX-1), dan F = tikus kelompok perlakuan (GFP-LOX-1).

(alum) (296.483,2) dan kontrol plasmid (pcDNA) (294.649,2) (Tabel 5.6, Lampiran 6). Walaupun secara statistik tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok ($p = 0,371$), penurunan ekspresi LOX-1 menunjukkan bahwa vaksinasi LOX-1 tampak sedikit menghambat ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta.

Tabel. 5.6. Perbandingan ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta yang dinyatakan dalam CTCF (*Corrected Total Cell Fluorescence*).

Kelompok	CTCF (SD)	P value
Kontrol -	199084,6 (28827,38)	
Kontrol +	281019,3 (44794,52)	0,509
Alum	296483,2 (33478,73)	0,297
pcDNA	294649,2 (87922,29)	0,362
pLOX-1	277610,6 (2296,59)	0,634
pGFP-LOX-1	258528,8 (37131,95)	0,833

Pada pengukuran ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta, dilakukan pengukuran intensitas fluoresensi dengan menggunakan antibodi sekunder terkonjugasi dengan FITC yang juga berwarna hijau yang sama dengan fluoresensi GFP yang mungkin dipancarkan oleh LOX-1 rekombinan yang diekspresikan dari vaksin DNA yang diinjeksikan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, ada dugaan ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta berasal dari ekspresi GFP-LOX-1 rekombinan dan bukan merupakan ekspresi LOX-1 endogen pada sel endotel jaringan aorta. Penelitian sebelumnya oleh House *et al.* (2016) dan Chen *et al.* (1998) juga menggunakan GFP sebagai marker ekspresi protein rekombinan dan antibodi sekunder terkonjugasi FITC untuk analisa ekspresi protein pada jaringan.

House *et al.* menggunakan mencit transgenik dengan GFP marker untuk menunjukkan ekspresi *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) pada jaringan miokardiak mencit dan menggunakan antibodi sekunder terkonjugasi FITC untuk menganalisa ekspresi CD45 dan dalam uji *Terminal deoxynucleotidyl transferase*

dUTP-mediated nick-end labeling (TUNEL) pada area peri-infract mencit. (House *et al.*, 2016). Chen *et al.* mendemonstrasikan penggunaan antibodi anti-GFP terkonjugasi FITC pada sel kultur *oligodendrocytes* yang ditransfeksi dengan *adeno-associated virus* (AAV) yang membawa gen penyandi *myelin basic protein* (*MBP*) *transcription control region* yang dikonjugasikan dengan GFP. Chen *et al.* juga menggunakan penelitian *in vivo* dengan mentransfeksikan AAV dengan *construct* yang sama dan menganalisa ekspresi GFP dengan antibodi terkonjugasi FITC 15 hari paska transfeksi (Chen *et al.*, 1998). Kedua penelitian tersebut menunjukkan tidak ada interfensi GFP rekombinan pada analisa ekspresi dengan metode imunostaining dengan antibodi terkonjugasi FITC.

Dalam penelitian ini, vaksin DNA LOX-1 diinjeksikan secara langsung pada sel otot tanpa pembawa (*naked*). Pemberian vaksin DNA *naked* memiliki keunggulan karena paling minim efek samping dan mudah dilakukan (tidak membutuhkan peralatan lain, misalnya elektroporator dan *gene gun*) (Niidome *et al.*, 2002). Adanya nuclease serum dan fagositosis oleh sel mononuclear juga menyebabkan vaksin DNA tidak tersebar ke area lain selain area injeksi. Penelitian oleh Sheets *et al.*, 2006 menunjukkan bahwa bio-distribusi dari berbagai vaksin DNA sangat terbatas. Vaksin DNA yang diberikan tidak terdistribusi ke area lain (darah, hati, gonad, jantung, timus, paru-paru, kelenjar adrenal, ginjal, limpa, sumsum tulang belakang, dan otak) selain area injeksi (jaringan otot dan *subcutis*).

Jenis vaksin dan promotor yang digunakan tidak mempengaruhi bio-distribusi vaksin DNA. Studi ini juga menunjukkan jumlah vaksin DNA telah berkurang secara signifikan seminggu setelah injeksi dan hanya sebagian kecil (100 *copies*) yang terdeteksi 2 bulan paska injeksi pada area injeksi pada 10% hewan coba. Hal

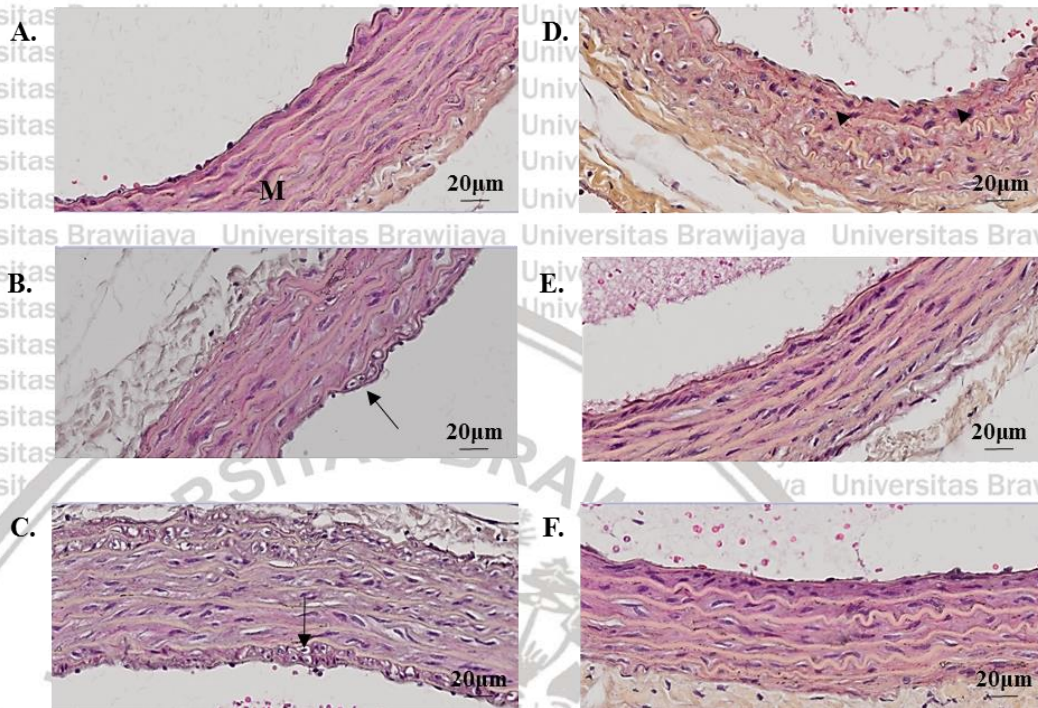
ini menunjukkan bahwa vaksin DNA *naked* tidak terintegrasi ke sistem inang (Sheets *et al.*, 2006).

5.3.5. Vaksinasi pLOX-1 dengan adjuvan alum dapat mencegah kerusakan struktur intima media jaringan aorta dan menurunkan jumlah sel busa

Vaksinasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 dapat mencegah perubahan struktur sel penyusun aorta pada tikus dengan diet tinggi lemak. Hal ini dapat diamati pada Gambar 5.8. Jaringan aorta pada tikus dengan diet normal memiliki struktur yang normal tanpa adanya tanda kerusakan. Struktur endotel terlihat normal, tidak ditemui adanya sel busa pada lapisan sub-intima, infiltrasi mononuklear pada lapisan intima media, dan apoptosis serta disorientasi sel otot polos. Jaringan aorta pada tikus yang menerima diet tinggi lemak saja tanpa perlakuan menunjukkan banyak terjadinya pembentukan sel busa pada area sub-intima serta infiltrasi monosit yang merupakan penanda terjadinya aterosklerosis tahap awal. Rekrutmen monosit dan makrofag ke dalam bagian intima media menunjukkan sel endotel telah mengalami disfungsi dan melepaskan mediator inflamasi yang menarik monosit dan makrofag.

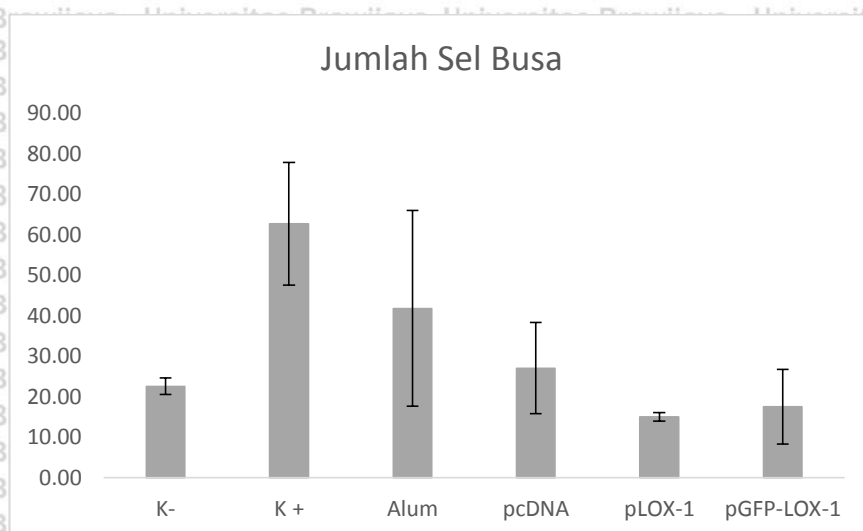
Pada tikus yang menerima vaksin alum juga terjadi pembentukan sel busa pada area sub-intima. Pada beberapa bagian juga tampak hilangnya struktur sel otot polos. Apoptosis sel otot polos pada umumnya terjadi pada tahap akhir pembentukan plak aterosklerosis, namun juga dapat diamati pada lesi awal aterosklerosis. Demikian pula jaringan aorta tikus yang menerima vaksin berupa plasmid kosong (pcDNA) juga mengalami kerusakan jaringan aorta yang ditunjukkan dengan infiltrasi monosit dan disorientasi sel otot polos. Sebaliknya jaringan aorta tikus yang divaksinasi dengan pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 menunjukkan struktur yang relatif normal dan rapat. Pada beberapa bagian dapat

diamati adanya infiltrasi mononuklear tetapi dalam jumlah yang minim. Jumlah dan susunan sel otot polos terlihat normal.



Gambar 5.8. Vaksin DNA LOX-1 dapat mencegah kerusakan struktur jaringan aorta tikus dengan diet tinggi lemak. Jaringan aorta pada tikus dengan diet normal tampak normal, dengan ketebalan lapisan yang sama, struktur sel otot polos tampak jelas dan tidak ada sel busa yang terbentuk (A). Jaringan aorta pada tikus dengan diet tinggi lemak tanpa vaksinasi (B), dengan vaksinasi alum (C), dan pcDNA (D) mengalami kerusakan struktur, tampak adanya sel busa pada lapisan sub-intima (tanpa panah) serta disorientasi dan hilangnya sel otot polos (mata anak panah). Jaringan aorta pada tikus dengan vaksinasi pLOX-1 (E) dan pGFP-LOX-1 (F) memiliki struktur yang normal dan rapat. Jaringan aorta dengan HE staining diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

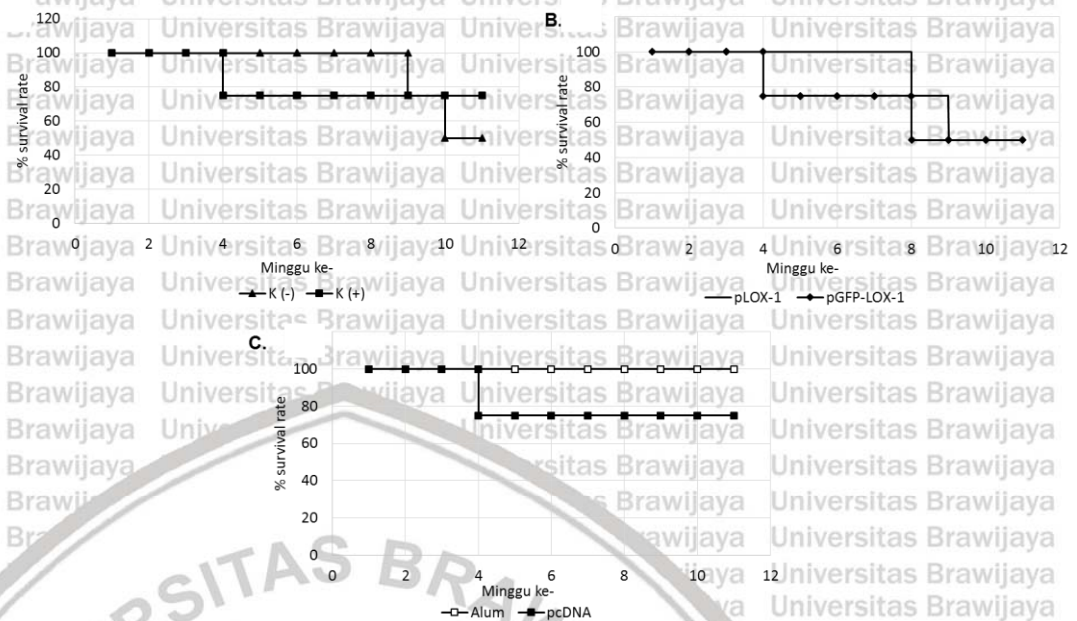
Penghitungan jumlah sel busa menunjukkan bahwa tikus yang menerima vaksinasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 memiliki jumlah sel busa yang lebih rendah dibandingkan tikus kontrol yang tidak divaksin, menerima alum atau plasmid kosong (Gambar 5.9). Tidak ada perbedaan antara jumlah sel busa pada semua kelompok ($p = 0,096$) (Lampiran 7).



Gambar 5.9. Perbandingan jumlah sel busa rata-rata pada jaringan aorta tikus. Penghitungan dilakukan sebanyak 3 kali pada keseluruhan jaringan aorta. Tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok ($p = 0,096$).

5.3.6. *Survival rate* tikus Wistar dengan diet tinggi lemak

Dalam penelitian ini, jumlah kematian hewan coba cukup tinggi. Kematian hewan coba tersebut terutama disebabkan karena lamanya waktu penelitian dan kurang terstandarnya kondisi perawatan hewan coba. Persen *survival rate* dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mulai awal perlakuan hingga akhir perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.10. Kematian hewan coba mulai terjadi sejak pemberian diet tinggi lemak. Kelompok yang diberi diet normal relatif lebih resistan dan 75% dapat bertahan hingga akhir perlakuan. Walaupun demikian perhitungan statistika tidak menunjukkan adanya perbedaan yang berarti pada *survival rate* antar kelompok ($p = 0,6962$). Pemberian diet tinggi lemak memicu terjadinya perubahan metabolisme yang memicu kematian hewan coba. Kondisi kandang yang kurang terstandar, yaitu suhu ruangan yang tidak terkontrol, sanitasi, dan kebersihan ruangan yang kurang terjaga menyebabkan tingkat kematian hewan coba tinggi.



Gambar 5.10. Persentase *survival rate* tikus Wistar kelompok kontrol (A dan B) dan kelompok perlakuan (C).

5.4. Pembahasan

5.4.1. pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 dikenali oleh sistem ekspresi mamalia dan berpotensi digunakan sebagai vaksin DNA

Vaksin DNA merupakan jenis vaksin baru berupa plasmid DNA yang membawa gen penyandi antigen yang diekspresikan di dalam sel inang (Williams, 2013). pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 yang *diconstruct* menggunakan pcDNA3.1 sebagai plasmid pembawanya diuji kemampuannya untuk dikenali oleh sistem ekspresi sel HeLa yang dipilih sebagai model sel inang. Plasmid pcDNA3.1 dipilih karena membawa komponen-komponen yang dibutuhkan dalam vaksin DNA yaitu berupa promoter CMV, poliA, gen penyandi resistensi ampisilin, MCS, dan ori (Yurina, 2018). pcDNA3.1 telah digunakan dalam penelitian-penelitian lain tentang vaksin DNA dan terbukti dapat digunakan sebagai pembawa gen penyandi antigen (Haer, *et al.*, 2007, 2009; Petrovan, *et al.*, 2007). pcDNA3.1 memiliki promoter CMV yang dikenali oleh sistem ekspresi mamalia pada berbagai jenis sel.

Promoter CMV merupakan salah satu promoter kuat dengan tingkat ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan promoter lainnya (Xia, *et al.*, 2006; Zarrin, *et al.*, 1999).

Untuk menghantarkan pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 ke dalam sel HeLa digunakan metode lipotransfeksi atau penghantaran DNA ke dalam sel dengan menggunakan pembawa lipid. Penghantaran DNA dengan pembawa non viral berbasis lipid memiliki keunggulan karena bersifat non-imunogenik, mudah diproduksi, serta non-onkogenik (Cui, *et al.*, 2012). Selain itu, pembawa lipid mampu melindungi DNA dari lingkungan dan memfasilitasi masuknya DNA ke dalam sel (Kulkarni, *et al.*, 2017). Sebagai pembawa DNA, lipid memiliki karakteristik yang sama dengan membran sel sehingga dapat menembus dan menghantarkan DNA dengan baik ke dalam sel. Penelitian menunjukkan bahwa lipid menghantarkan DNA melalui mekanisme endositosis dengan mediasi *clathrin* dan *caveola* atau melalui mekanisme *macropinocytosis* (Adil, *et al.*, 2014; Cui, *et al.*, 2012). Di dalam sel, DNA akan dilepaskan ke dalam sel kemudian dihantarkan ke dalam nukleus.

Pembawa lipid yang digunakan dalam penelitian ini merupakan golongan liposom kationik yang dapat berikatan dengan DNA yang bersifat negatif. Kompleks akhir DNA-liposom yang terbentuk bermuatan positif sehingga dapat berinteraksi dengan membran sel yang bermuatan negatif dan menghantarkan DNA ke dalam sel (Felgner, *et al.*, 1987). Oleh karena itu perbandingan jumlah liposom kationik dan DNA sangat menentukan keberhasilan proses transfeksi. Dalam penelitian ini dilakukan optimasi untuk menentukan perbandingan jumlah lipid dan DNA yang ideal. Dari hasil optimasi ditemukan bahwa perbandingan yang ideal antara jumlah lipid dan DNA adalah 1 : 2. Jumlah lipid yang terlalu banyak (> 100 µg) dapat bersifat toksik terhadap sel. Dalam penelitian ini digunakan 50 µg DNA dan 25 µg

lipid. Toksisitas ini juga dipengaruhi oleh jenis sel yang ditransfeksi, lama paparan lipid terhadap sel, serta densitas sel (Felgner, *et al.*, 1987).

Eksresi LOX-1 dan GFP-LOX-1 diamati pada jam ke-6, -12, -18, dan -24 paska transfeksi. Sel HeLa yang ditransfeksi dengan pGFP-LOX-1 menunjukkan bahwa ekspresi protein paling tinggi dapat dilihat pada jam ke-18 paska transfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa 18 jam setelah transfeksi, DNA telah berhasil masuk ke dalam sel dan inti sel serta diekspresikan dengan level yang paling tinggi oleh sel HeLa. Ekspresi protein *transient* pada sel HeLa yang ditransfeksi dengan menggunakan pembawa berbasis lipid pada umumnya teramati 24-72 jam setelah transfeksi. Beberapa hal lain dapat mempengaruhi ekspresi protein tersebut, diantaranya kondisi kultur, kualitas dan kuantitas DNA, ukuran dan konfigurasi DNA (Nikcevic, *et al.*, 2003).

Pengukuran ekspresi mRNA LOX-1 dan GFP-LOX-1 menggunakan metode qRT-PCR menunjukkan bahwa sel yang ditransfeksi dengan pLOX-1 mengekspresikan mRNA LOX-1 ~300 kali lipat lebih tinggi dibandingkan HeLa yang tidak ditransfeksi. LOX-1 merupakan gen yang juga diekspresikan oleh sel HeLa. Gen yang berperan dalam metabolisme lipid, termasuk LOX-1, diketahui juga memiliki peran dalam transformasi sel. LOX-1 diketahui mengalami peningkatan ekspresi pada sel kanker. Peningkatan ekspresi gen yang berkaitan dengan metabolisme lipid berperan dalam aktivasi tumorigenesis (Hirsch, *et al.*, 2011).

Walaupun demikian, kadar mRNA LOX-1 yang jauh lebih tinggi pada sel yang ditransfeksi membuktikan bahwa pLOX-1 dengan promoter CMV dapat dikenali oleh sistem ekspresi HeLa. mRNA GFP-LOX-1 diekspresikan sekitar ~275 ribu kali lebih tinggi pada sel HeLa yang ditransfeksi dengan pGFP-LOX-1 dibandingkan yang tidak ditransfeksi. Perbedaan yang sangat besar ini terjadi karena secara

normal HeLa tidak memiliki gen GFP-LOX-1 sehingga GFP-LOX-1 dapat dikatakan sama sekali tidak diekspresikan oleh HeLa.

Protein LOX-1 dan GFP-LOX-1 dianalisa dengan *Western Blot* memperlihatkan adanya pita berukuran ~45 kDa yang merupakan ukuran protein LOX-1 matang pada semua ekstrak protein dari kultur sel HeLa yang ditransfeksi dan yang tidak ditransfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa LOX-1 memang diekspresikan secara alami oleh sel HeLa. Walaupun demikian adanya pita CTLD-LOX-1 yang berukuran sekitar 14 kDa menunjukkan bahwa pLOX-1 dikenali oleh sel HeLa dan CTLD LOX-1 dapat diekspresikan oleh sel HeLa. Pita CTLD-LOX-1 hanya dapat diamati pada ekstrak protein yang diisolasi dari kultur 18 jam post-transfeksi yang menunjukkan bahwa level ekspresi LOX-1 tertinggi pada jam tersebut.

5.4.2. Tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang dipanaskan mampu mensimulasikan kerusakan struktur intima media sebagai penanda awal terjadinya lesi aterosklerosis

Kandidat vaksin pLOX-1 diuji efektivitasnya dalam mencegah aterosklerosis pada tikus Wistar dengan diet tinggi lemak. Tikus bukan model yang sesuai untuk mempelajari kondisi aterosklerosis karena bentuk kolesterol lipid serum pada tikus mayoritas (80%) dalam bentuk HDL dan tidak memiliki *cholesterylester transfer protein* (CETP) (Russell & Proctor, 2006; Xiangdong, *et al.*, 2011). Walaupun demikian, tikus dengan diet tinggi lemak disertai dengan pemberian asam kolat (0,25% - 0,5% b/b) dan tiourasil (0,5% b/b) mampu menstimulasikan kondisi aterosklerosis. Asam kolat berperan dalam menginduksi hiperkolesterolemia melalui peningkatan absorpsi kolesterol dan lemak serta menghambat enzim 7 α -hidroksilase, enzim yang berperan dalam menghambat

konversi kolesterol menjadi asam empedu. Tiourasil berperan dalam menginduksi hipotiroid pada hewan model (Getz, 2005).

Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan oleh penulis menunjukkan bahwa pemberian diet tinggi lemak yang dipanaskan dan asam kolat dapat menginduksi peningkatan kolesterol LDL secara signifikan pada tikus Wistar 8 minggu setelah pemberian diet. Pemanasan komponen lipid dengan suhu tinggi (190°C) dan dalam waktu lama (24 jam) dapat menginduksi terjadinya oksidasi lipid (Eder, *et al.*, 2003; Garrido-Polonio, *et al.*, 2004; Urban, *et al.*, 2014). Lipid yang teroksidasi merupakan pemicu utama terjadinya disfungsi endotel dan pembentukan plak aterosklerotik.

Penelitian tersebut juga menunjukkan terjadinya perubahan struktur aorta pada tikus Wistar yang mengarah pada pembentukan lesi awal aterosklerosis, ditunjukkan dengan terjadinya infiltrasi mononuklear dan disorientasi sel otot polos pada intima media aorta tikus. Oleh karena itu, untuk menguji efektivitas vaksin DNA pLOX-1 dilakukan pengujian pada tikus Wistar dengan diet tinggi lemak dengan pemanasan yang diberikan 8 minggu setelah vaksinasi.

5.4.3. Vaksinasi pLOX-1 dengan alum sebagai adjuvan

Alum merupakan salah satu adjuvan yang sejak lama telah digunakan dalam vaksinasi, baik pada manusia maupun hewan. Alum teradsorpsi pada permukaan antigen melalui berbagai jenis interaksi, misalnya ikatan hidrofilik-hidrofobik, interaksi elektrostatik, atau ikatan antar ligan, yang tergantung pada karakteristik antigennya. Adsorpsi alum pada antigen menyebabkan terbentuknya partikulat antigen yang kurang larut sehingga memiliki waktu retensi yang lebih tinggi di daerah administrasi. Bentuk partikulat ini juga menginduksi interaksi dengan APC dan fagositosis (Ghimire, 2015). Injeksi dengan alum juga diketahui

meningkatkan pemanggilan leukosit, sel dendritik, dan makrofag serta menginduksi ekspresi dan pelepasan sitokin, *chemokine*, dan molekul *adhesin* (Kool, *et al.*, 2012). Alum juga telah dipakai dalam beberapa penelitian vaksin DNA dan terbukti dapat meningkatkan respon imun (Song, *et al.*, 2017; Ulmer, *et al.*, 1999).

Pada studi ini, pLOX-1 merupakan bentuk vaksin DNA yang didesain untuk diekspresikan sebagai antigen intraselular. Sebagai antigen intraselular, protein CTLD LOX-1 diharapkan dipresentasikan oleh MHC kelas I yang selanjutnya akan menginduksi respon imun sel T. Selanjutnya diharapkan sel Th yang teraktivasi akan meningkatkan aktivitas sel T sitotoksik CD8+ dan sel T CD4+. Selain itu, sel dendritik juga mengekspresikan IFN tipe I yang berperan dalam mengaktivasi sel T CD8+ dan T CD4+. Sel T CD8+ merupakan respon imun selular yang diharapkan bekerja melalui induksi lisis sel endotel yang mengekspresikan LOX-1 secara berlebihan. Sedangkan sel T CD4+ akan menginduksi aktivasi sel B sehingga berkembang menjadi sel B plasma dan sel B memori yang menghasilkan antibodi anti-LOX-1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa injeksi pLOX-1 dengan alum tidak menginduksi peningkatan antibodi secara bermakna pada semua kelompok (Murti, 2017). Hal ini menunjukkan bahwa vaksin DNA-LOX-1 tidak menginduksi sistem imun humoral secara poten. Walaupun demikian, karena keterbatasan fasilitas, tidak dilakukan pengujian terhadap respon imun selular. Hal ini menyebabkan belum dapat dianalisisnya mekanisme kerja vaksin DNA-LOX-1.

Dalam eksperimen ini, jumlah DNA yang diinjeksikan adalah 50 µg per tikus. Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Song *et al.*, 2017, yang menunjukkan bahwa 50 µg vaksin DNA yang dikombinasikan dengan adjuvan alum mampu meningkatkan respon imun vaksin DNA. Dalam

penelitian ini tidak dilakukan pengukuran ekspresi LOX-1 secara *in vivo* karena keterbatasan penelitian sehingga tidak dapat digambarkan efektivitas transfeksi dan ekspresi LOX-1.

5.4.4. pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 mencegah aktivasi sel endotel melalui penghambatan penurunan ekspresi eNOS dan ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta tikus dengan diet tinggi lemak

Nitric Oxide (NO) merupakan marker kondisi sel endotel yang dibentuk dari prekursornya berupa *L-arginine* melalui reaksi enzimatik dengan katalis eNOS.

Penurunan kadar NO dan aktivitas eNOS menunjukkan disfungsi endotel dan pencetus aterosklerosis (Deanfield, *et al.*, 2007). Hasil eksperimen memperlihatkan bahwa tikus dengan diet normal tampak memiliki ekspresi eNOS paling tinggi dibandingkan kelompok-kelompok lain yang menerima diet tinggi lemak. Hal ini menunjukkan bahwa diet tinggi lemak memicu terjadinya hiperkolesterolemia yang diikuti dengan disfungsi endotel. Tikus yang menerima vaksinasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 memiliki ekspresi eNOS yang tampak lebih rendah dibandingkan tikus yang tidak divaksinasi atau divaksinasi dengan alum atau plasmid kosong. Mekanisme aksi pencegahan produksi eNOS diprediksi terjadi melalui lisis sel endotel yang mengekspresikan LOX-1 dalam jumlah tinggi.

Disfungsi endotel diikuti dengan aktivasi NF- κ B dan pelepasan sitokin pro-inflamasi dan molekul adhesin (Libby *et al.*, 2009). Penelitian pendukung menunjukkan bahwa tikus Wistar yang menerima diet tinggi lemak mengalami peningkatan aktivasi NF- κ B, ekspresi IL-6 dan TNF- α secara signifikan pada sel endotel jaringan aorta. Vaksinasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 mampu mencegah peningkatan aktivasi NF- κ B, ekspresi IL-6 dan TNF- α pada sel endotel jaringan aorta (Parhusip, 2017, Al-Muyasaroh, 2017, Aisyafuri, 2017).

Kelompok yang mendapatkan vaksinasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 mengekspresikan LOX-1 dengan kadar yang sedikit lebih rendah dibandingkan tikus kontrol yang tidak divaksinasi maupun tikus kontrol yang menerima alum atau pcDNA saja. LOX-1 yang terakspresi dalam jumlah tinggi menunjukkan kondisi sel endotel yang teraktivasi. Dalam kondisi normal, LOX-1 diekspresikan dalam kadar yang rendah. Peningkatan ekspresi LOX-1 dapat dipicu oleh berbagai kondisi, diantaranya hipertensi, diabetes mellitus, dan hiperkolesterolemia (Hermonat, *et al.*, 2011). Hasil penelitian membuktikan vaksinasi DNA pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 diduga mampu mencegah ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta walaupun pengulangan penelitian harus dilakukan karena banyaknya tikus yang mati dalam penelitian ini. Kadar eNOS yang sedikit lebih tinggi ($p=0,419$) serta ekspresi LOX-1 yang sedikit lebih rendah ($p = 0,371$) menunjukkan bahwa sel endotel teraktivasi atau mengalami disfungsi dapat dicegah melalui vaksinasi DNA pLOX-1 dan pGFP-LOX-1.

5.4.5. pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 mampu mencegah kerusakan struktur aorta pada tikus dengan diet tinggi lemak

Analisa histopatologi aorta mengindikasikan terjadinya perubahan struktur intima media aorta pada tikus dengan diet tinggi lemak, yaitu adanya infiltrasi sel mononuklear yang menunjukkan rekruitmen sel monosit dan makrofag pada daerah lesi. Hal ini menunjukkan bahwa disfungsi endotelial telah terjadi sehingga terjadi pelepasan sitokin dan molekul *adhesin* yang merekrut monosit masuk ke area intima media (Libby, 2003). Selanjutnya terjadi migrasi sel otot polos ke area media dan aktivasi sel otot polos melalui ikatan LOX-1 pada permukaan sel otot polos dan *ox-LDL*. Sel otot polos yang teraktivasi dapat mengalami perubahan struktur dan apoptosis, yang teramati melalui disorientasi sel otot polos pada

jaringan aorta tikus dengan diet tinggi lemak. Ambilan ox-LDL oleh makrofag menyebabkan terbentuknya sel busa.

Kerusakan struktur intima media dan pembentukan sel busa ini dapat diamati pada tikus dengan diet tinggi lemak yang tidak divaksin, divaksin dengan alum, dan plasmid kosong saja. Tikus dengan diet tinggi lemak yang menerima vaksin pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 memiliki struktur intima media aorta yang relatif normal dan rapat, walaupun terjadi beberapa infiltrasi mononuklear tetapi jumlahnya minimal. Demikian pula struktur sel otot polos tampak normal pada kedua kelompok perlakuan ini. Hal ini menunjukkan bahwa migrasi dan aktivasi sel otot polos dapat dihambat melalui vaksinasi pLOX-1 dan pGFP-LOX-1.

Dalam kondisi aterosklerosis, aktivasi dan migrasi sel otot polos disertai dengan pembentukan *extracellular matrix* (ECM) yang ditandai dengan peningkatan ketebalan dinding aorta. Penelitian pendukung yang dilakukan oleh Atyanta, 2017 juga memperlihatkan bahwa tikus yang divaksin dengan pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 memiliki ketebalan intima media yang lebih rendah dibandingkan tikus yang tidak divaksinasi (Atyanta, 2017). *ox-LDL* yang masuk ke area intima media ditangkap oleh makrofag melalui reseptor LOX-1 yang juga terekspressi pada permukaan makrofag (Chistiakov, *et al.*, 2016). Masuknya *ox-LDL* ke dalam makrofag diikuti dengan pembentukan sel busa. Dalam penelitian ini ditunjukkan bahwa vaksinasi dapat sedikit menurunkan jumlah sel busa pada kelompok yang menerima vaksin pLOX-1 dan pGFP-LOX-1. Jumlah sel busa yang teramati pada area sub-intima tampak lebih rendah ($p = 0,096$) dibandingkan pada tikus yang tidak divaksin atau tikus dengan vaksin kosong atau alum saja.

Keterbatasan penelitian ini adalah jumlah sampel yang minim akibat kematian hewan coba sebelum waktu perlakuan berakhir. Kematian hewan coba

akibat kurang terstandarnya kondisi kandang dan perawatan hewan coba serta lamanya waktu perlakuan menyebabkan tingginya tingkat kematian hewan coba.

Walaupun secara statistik jumlah sampel kurang memenuhi persyaratan, namun pengamatan histopatologi secara langsung oleh ahli Patologi Anatomi menunjukkan perbedaan struktur aorta antara kelompok. Pengamatan histopatologi bersifat deskriptif kualitatif sehingga penilaian tidak hanya didasarkan pada kekuatan besar sampel.

6.5. Kesimpulan

1. Vaksin DNA LOX-1 diekspresikan pada sel mamalia (sel Hela).
2. Vaksin DNA LOX-1 diduga mampu menghambat pembentukan sel busa pada aorta tikus dengan diet tinggi lemak.
3. Ekspresi LOX-1 pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1 tampak menurun.
4. Ekspresi eNOS pada sel endotel aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1 tampak dihambat penurunannya.

6.6. Saran

1. Perlu dilakukan analisa ekspresi pada jenis sel mamalia lain, terutama sel yang menjadi target utama dalam vaksinasi, misalnya sel miosit atau sel dendritik.
2. Perlu dibuat *construct* pLOX-1 dengan gabungan gen penyandi LOX-1 dengan gen lain yang bersifat imunopoten sehingga dapat memicu sistem imun lebih baik.

3. Perlu dilakukan pengulangan pengujian dengan menggunakan tikus dengan strain lain atau tikus transgenik yang mampu menstimulasikan kondisi aterosklerosis dengan lebih baik.
4. Perlu dilakukan pengulangan pengujian dengan jumlah sampel per kelompok yang lebih besar karena tingkat kematian hewan coba yang tinggi.
5. Perlu dilakukan pengujian dengan variasi dosis, rute pemberian, dan adjuvan yang dapat memicu respon imun secara optimal.





BAB VI

PENELITIAN TAHAP II

ANALISA POTENSI VAKSIN SUBUNIT REKOMBINAN LOX-1 DALAM MENCEGAH DEPOSISI LIPID PADA *ABDOMINAL MESENTRIC ARTERY* SHR-SP DENGAN DIET TINGGI LEMAK

6.1. Pendahuluan

6.1.1. Perumusan Masalah

1. Apakah sel *L. lactis* yang diinduksi dengan nisin dapat mengekspresikan LOX-1 rekombinan (subunit LOX-1)?
2. Apakah vaksin subunit LOX-1 dapat menurunkan jumlah area deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan diet tinggi lemak?
3. Apakah vaksin subunit LOX-1 dapat meningkatkan kadar antibodi anti-LOX-1 pada serum SHR-SP dengan diet tinggi lemak?
4. Apakah vaksin subunit LOX-1 dapat menurunkan kadar lipid serum SHR-SP dengan diet tinggi lemak?

6.1.2. Tujuan

1. Menentukan ekspresi LOX-1 rekombinan pada *L. lactis* yang diinduksi dengan nisin.
2. Menentukan jumlah area deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1.
3. Menentukan kadar antibodi IgG anti-LOX-1 pada serum SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1.

4. Menentukan profil lipid serum dan tekanan darah SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang telah divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1.

6.2. Metode Penelitian Tahap II

6.2.1. Desain penelitian

Pada penelitian tahap II dikembangkan *construct* plasmid pNZ8148 yang mengandung gen sisipan penyandi CTLD-LOX-1 (human *olr1*) yang difusikan dengan gen penyandi GFP. Plasmid ini akan ditransformasikan pada *Lactococcus lactis* NZ9000 yang digunakan sebagai pembawa vaksin subunit LOX-1. Pada penelitian tahap juga II digunakan desain eksperimen murni rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* dengan menggunakan hewan coba berupa tikus (*R. norvegicus*) strain *spontaneous hypertensive rats – stroke prone* (SHR-SP) yang dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol menerima vaksinasi 1×10^{10} *colony forming unit* (CFU) *L. lactis* rekombinan yang mengandung pNZGFP dan kelompok perlakuan menerima vaksinasi 1×10^{10} CFU *L. lactis* rekombinan yang mengandung pNZGFP-LOX-1. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Shinshu University, Matsumoto, Nagano melalui surat persetujuan Laik Etik No. 290036 (penelitian hewan) dan 17-076 (penelitian DNA rekombinan) (Lampiran 8).

6.2.2. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

6.2.2.1. Lokasi Penelitian

Penelitian tahap II dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Sekolah Kedokteran, Shinshu University.

6.2.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian tahap II dilaksanakan selama 6 bulan, mulai Oktober 2017 – Maret 2018.

6.2.3. Populasi dan sampel

6.2.3.1. Batasan Populasi

Populasi dalam penelitian tahap II adalah seluruh tikus (*R. norvegicus*) galur SHR-SP. Sedangkan sampel adalah tikus putih jantan galur SHR-SP yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian. Tikus putih galur SHR-SP dipilih sebagai hewan coba karena dapat menstimulasikan kondisi aterosklerosis melalui pemberian diet tinggi lemak dalam waktu singkat yang diamati melalui deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* (Nakano, *et al.*, 2010; Ogata, *et al.*, 1982; Hamakawa, *et al.*, 2003; Harvey, *et al.*, 2017).

6.2.3.2. Kriteria sampel

Sampel pada penelitian tahap II adalah yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

Kriteria inklusi:

- Tikus (*R. norvegicus*) strain SHR-SP jantan
- Kondisi sehat, ditandai dengan gerak aktif
- Usia 4 minggu
- Bobot 100-150 g

Kriteria eksklusi:

- pernah digunakan dalam percobaan dengan diet tinggi lemak lainnya
- mengalami kecacatan fisik

6.2.3.3. Besaran sampel

Dalam penelitian ini digunakan dua kelompok hewan coba, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Besaran sampel masing-masing kelompok ditentukan berdasarkan rumus Federer sebagai berikut:

$(n-1)(p-1) \geq 15$, dengan n = jumlah pengulangan, p = jumlah kelompok perlakuan.

$$(n-1)(2-1) \geq 15$$

$$(n-1)(1) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$N \geq 8,5 \approx 9$$

Jadi jumlah hewan coba untuk tiap kelompok minimal adalah 9 ekor, total hewan coba yang dibutuhkan dalam penelitian adalah 18 ekor tikus Wistar.

6.2.3.4. Kelompok penelitian

Kelompok penelitian tahap II terdiri dari 2 (dua) kelompok dengan ketentuan sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol adalah 9 ekor tikus SHR-SP jantan yang mendapatkan vaksinasi 1×10^{10} CFU *L. lactis* pNZ9000 yang membawa plasmid pNZ8148-GFP.
2. Kelompok perlakuan adalah 9 ekor tikus SHR-SP jantan yang mendapatkan vaksinasi 1×10^{10} *L. lactis* pNZ9000 yang membawa plasmid pNZ8148-GFP-LOX-1.

6.2.3.5. Prosedur penentuan subyek penelitian

Dalam penelitian tahap II teknik penentuan subyek penelitian yang digunakan adalah *simple random sampling* menggunakan rancangan acak kelompok (RAK), di mana sampel dibagi ke dalam beberapa kelompok secara acak sesuai dan setiap hewan coba memiliki kesempatan yang sama untuk masuk dalam suatu kelompok. Metode yang digunakan adalah sistem *lotree*, sebanyak 2 kali. *Lotree* pertama menentukan kelompok yang akan diambil terlebih dahulu,

sedangkan *lotree* kedua untuk mengelompokkan tikus. Dalam menentukan perlakuan mana yang akan diambil terlebih dahulu maka digunakan *lotree* dengan 2 macam kertas, yakni kontrol dan perlakuan dimana kertas yang keluar lebih dulu adalah kelompok yang lebih dulu ditentukan anggotanya. Selanjutnya untuk menentukan pengelompokan hewan coba, masing-masing hewan coba diberi nomor 1 - 18 dan dilakukan *lotree* untuk menentukan kelompok dari masing-masing hewan coba dengan melakukan pengambilan nomor *lotree* 9 kali untuk 1 kelompok penelitian. Kertas atau nomor *lotree* yang sudah diambil tidak boleh dimasukkan kembali.

6.2.4. Variable Penelitian

6.2.4.1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vaksin pNZGFP-LOX-1 yang dibawa oleh *L. lactis* pNZ9000 yang diberikan melalui rute per oral sebanyak tiga kali dengan selang waktu pemberian dua minggu. Dalam setiap kali pemberian, vaksin diberikan selama tiga hari berturut-turut.

6.2.4.2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah area deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery*, kadar IgG serum anti-LOX-1, dan profil lipid SHR-SP.

6.2.5. Bahan dan Alat

6.2.5.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian tahap II ini adalah:

1. Bahan untuk preparasi dan pemberian vaksin: pLOX-1, pGFP-LOX-1, *L. lactis* pNZ900, PBS, saline (NaCl), media GM 17 Agar, media GM17

Broth, kloramfenikol, sonde (*curved*, 16 Gauge, panjang 7,6 cm, tip 3,0 mm)

2. Bahan untuk perawatan hewan coba: sekam dan air minum untuk tikus.
3. Bahan untuk pembedahan tikus dan pengambilan jaringan *abdominal mesenteric artery*: *isoflurane*, alkohol, kapas.
4. Bahan untuk pengukuran jumlah area deposisi lipid: jaringan *abdominal mesenteric artery*, formalin, *isopropanol*, *aqua destilata*, *Oil Red O*, *coverslip*.
5. Bahan untuk pengukuran kadar IgG anti-LOX-1 serum: microtiter plate, LOX-1 rekombinan, antibodi sekunder anti-rat IgG, substrat TMB, stop solution (H_2SO_4 2M).

6.2.5.2. Alat

Berikut adalah alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini:

1. Alat untuk preparasi vaksin: inkubator suhu 30°C, spektrofotometer, mikropipet.
2. Alat untuk perawatan hewan coba: kandang plastik standar perawatan yang telah dilengkapi oleh botol minum dan tempat makanan, sarung tangan karet, dan pembersih kandang.
3. Alat untuk pembedahan tikus : papan parafin, gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set.
4. Alat untuk penghitungan jumlah area deposisi lipid: mikroskop Olympus, *cell counter*.
5. Alat untuk penghitungan absorbansi IgG anti LOX-1 serum: ELISA reader, shaker, inkubator.

6.2.6. Definisi operasional

- **Tikus model aterosklerosis:** merupakan tikus SHR-SP yang menunjukkan deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* setelah 2 minggu pemberian diet tinggi lemak.
- **Diet tinggi lemak:** Diet tinggi lemak yang digunakan mengandung *cholate* 0,5 %, kolesterol 1,25%, kasein susu 20%, *cocoa butter* 15%, dan *α-tocopherol*: 2 mg/kg *chow*. Diet tinggi lemak disertai dengan pemberian normal saline (Otsuka) (9 g/L NaCl) sebagai pengganti air minum.
- **Vaksin LOX-1:** merupakan *Lactococcus lactis* NZ9000 yang membawa plasmid pNZ8148.Sec#2 GFP-LOX-1 pcDNA3.1 yang mengandung gen sisipan rat CTLD-LOX-1 yang telah dikonjugasikan dengan gen penyandi *green fluorecence protein*.
- **Deposisi lipid:** merupakan penumpukan sel-sel lemak yang diamati pada jaringan *abdominal mesenteric artery* dengan menggunakan pewarnaan *Oil Red O*.

6.2.7. Prosedur Penelitian Tahap II

6.2.7.1. Pembuatan *construct* pNZLOX-1, pNXZGFP, dan pNZGFP-LOX-1

Gen penyandi LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1 diamplifikasi dengan menggunakan primer yang telah ditambah dengan sisi pengenalan enzim restriksi yang sesuai, yaitu *KpnI* dan *HindIII* untuk primer GFP dan GFP-LOX-1 serta *BamHI* dan *HindIII* untuk primer LOX-1. Primer yang digunakan beserta karakteristiknya dapat dilihat pada Tabel 6.1.

Tabel 6.1. Primer untuk mengamplifikasi gen penyandi LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1

Primer	Sekuen (5'→3')
Rat LOX Fwd	GGATCCcataaagaaaactgttaccttccatgg
Rat LOX Rev	AAGCTTgctgagtaagcaataaattgccttc
GFP Fwd	GGTACCgtgagcaagggcgaggagctgttcacc
GFP Rev	AAGCTTgctgttacacgctgctccatgccgagag

Keterangan: Huruf capital menunjukkan situs pengenalan enzim restriksi

Reaksi amplifikasi dilakukan dengan menggunakan komposisi reaksi sebagai berikut:

- LA Taq 0,5 µL
- 10x LA buffer 2,5 µL
- MgCl₂ (25µM) 2,5 µL
- dNTP (2,5µM) 4,0 µL
- Primer *Forward* (10µM) 2,5 µL
- Primer *Reverse* (10µM) 2,5 µL
- DNA template 1 µL
- MilliQ water 9,5 µL

Kondisi reaksi yang digunakan untuk amplifikasi dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6.2. Kondisi reaksi amplifikasi gen penyandi LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1

Reaksi	Suhu (°C) / waktu (menit)		Jumlah siklus
	GFP dan GFP-LOX-1	LOX-1	
Denaturasi awal	94 / 1	94 / 1	1
Denaturasi	94 / 0,5	94 / 0,5	15
Penempelan	62 / 1	60 / 1	15
Pemanjangan	72 / 1	72 / 0,5	15
Pemanjangan akhir	72 / 10	72 / 10	1
Penyimpanan	4 / ∞	4 / ∞	1

Produk amplifikasi dielektroforesis kemudian dipotong dari gel dan dipurifikasi lebih lanjut dengan menggunakan metode presipitasi etanol. Gel hasil pemotongan dimasukkan ke dalam kolom kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 x G, 10 menit, 4°C. Hasil sentrifuga ditambah dengan Natrium

Asetat 3M sebanyak 1/10 x eluen dan etanol absolut sebanyak 2 x volume total.

Campuran disentrifugasi (15.000 rpm, 15 menit, 4°C). *Pellet* dicuci dengan 500 µL

etanol absolut dingin kemudian disentrifugasi kembali (15.000 rpm, 10 menit, 4°C).

Pellet dikeringanginkan kemudian diresuspensi dengan 5µL buffer TE.

Produk PCR yang sudah dipurifikasi diligasikan dengan vector pCR[®]2.1-

TOPO (Invitrogen) dengan komponen reaksi sebagai berikut:

- Produk PCR 4,0 µL
- Salt solution 1,0 µL
- Vector 1,0 µL

Campuran diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang kemudian ditransformasikan pada *E. coli* Top10 dengan menggunakan metode *heat shock*.

Transforman ditumbuhkan pada media LB broth yang telah ditambah dengan ampisilin 100 µg/mL selama semalam pada suhu 37°C. Transforman yang tumbuh

kemudian diinokulasi pada media LB *broth* yang telah ditambah ampisilin 100µg/mL kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, 200 rpm, 6-18 jam. Selanjutnya

plasmid diisolasi menggunakan Kurabo *Automatic DNA Isolation System*. Hasil isolasi dikarakterisasi menggunakan analisa restriksi dan sekuensing. Analisa

restriksi dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi yang sesuai dan dilakukan pencampuran komponen reaksi sebagai berikut:

- Plasmid 1,0 µL
- Buffer A 2 µL
- Enzim 1 0,2 µL
- Enzim 2 0,2 µL
- MilliQ water 7,6 µL

Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam. Plasmid yang telah direstriksi kemudian dielektroforesis.

Selain itu, juga dilakukan analisa sekuensing untuk mengkonfirmasi kebenaran urutan gen yang dikloning. Untuk mempersiapkan rekasi sekuensing dilakukan pencampuran komponen dalam 20 µL sebagai berikut:

- DNA template 10 µL
- Mix RR 2,0 µL
- Buffer 5x 4,0 µL
- Primer 1,6 µL
- MilliQ water 2,4 µL

Primer yang digunakan adalah primer M13 *forward* dan M13 *reverse* yang mengenali bagian pada vektor pCR[®]2.1-TOPO. Reaksi amplifikasi dilakukan dengan menggunakan BigDye Terminator V3.1 (Thermo Fisher). Produk PCR dimurnikan menggunakan kolom (Edge Bio Gel Filtration) kemudian ditentukan urutan nukleotidanya.

Gen sisipan yang telah diverifikasi selanjutnya diligasikan ke pNZ8148, plasmid yang digunakan untuk ekspresi pada *L. lactis*. pCR[®]2.1-TOPO yang mengandung gen penyandi LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1 serta pNZ8148 direstriksi dengan enzim yang sesuai. Produk pemotongan dipurifikasi dari gel kemudian dire-ligasikan kembali sehingga diharapkan terbentuk pNZ8148 yang mengandung gen penyandi LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1, yang selanjutnya disebut sebagai pNZLOX-1, pNZGFP, pNZ-GFP-LOX-1. Reaksi ligasi dilakukan dengan menggunakan Ligation High Ver 2 (Toyobo). Campuran diinkubasi pada 16°C selama 30 menit kemudian ditransformasikan ke *E. coli* MC1061 kompeten dengan menggunakan elektroporator (Biorad Gene Pulser Xcell™ Electroporation

Systems) dengan kekuatan $C = 25 \mu\text{F}$, $PC = 200\Omega$, dan $V = 1,8\text{kV}$. Setelah dilakukan elektroporasi, sel kompeten segera ditambah dengan media SOC kemudian diinkubasi 1 jam pada inkubator goyang dengan suhu 37°C , 200 rpm. Selanjutnya kultur disebar pada media LB agar yang telah ditambah dengan kloramfenikol $10\mu\text{g/mL}$ kemudian diinkubasi 1-2 hari. Koloni yang tumbuh kembali dikarakterisasi dengan menggunakan analisa restriksi dan sekuensing. Hasil sekuensing menunjukkan adanya mutasi pada gen penyandi GFP sehingga dilakukan kloning ulang dengan menggunakan kodon yang dioptimasi untuk ekspresi *L. lactis*.

Gen penyandi GFP-LOX-1 dengan kodon yang telah disesuaikan untuk *L. lactis* disintesis secara kimia (Eurofins Genomic). Gen penyandi GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1 dikonjugasikan dengan Usp45 sebagai *signal peptide L. lactis* dan 6xHis *taq*. Gen penyandi GFP-LOX-1 dan pNZ8184Sec#2 direstriksi dengan enzim restriksi yang sesuai (Toyobo) sehingga diperoleh gen penyandi GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1 (Tabel 6.3). Seluruh komponen reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Hasil restriksi dielektroforesis pada agarose (Invitrogen) 1% kemudian pita hasil restriksi dipotong dari gel.

Tabel 6.3. Komponen reaksi restriksi

Komponen reaksi	Jumlah (μL)		
	GFP-LOX-1	GFP	LOX-1
Plasmid	1,0	1,0	1,0
Buffer A	2	2	2
Enzim 1	BamHI: 0,2	BamHI: 0,2	KpnI:0,2
Enzim 2	HindIII: 0,2	KpnI : 0,2	HindIII: 0,2
BSA	0	1	1
MilliQ water	7,6	6,6	6,6
Total	10	10	10

Gel dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan metode presipitasi etanol. Produk yang sudah dipurifikasi diligasikan dengan vector pNZ8184Sec#2

dengan komponen reaksi ligase yang sama dengan sebelumnya. Campuran diinkubasi selama semalam pada suhu 16°C kemudian ditransformasikan pada sel elektrokompeten *E. coli* MC1061 (Lucigen) dengan menggunakan metode elektroporasi (Gene Pulser X Cell, Biorad) pada kondisi 1600V, 10µF, 600Ω kemudian segera ditambahkan 1mL media *recovery* (Lucigen). Sel diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, 200 rpm. Transforman ditumbuhkan pada media LB *broth* (BD Difco™) yang telah ditambah ampisilin 100µg/mL selama semalam pada suhu 37°C.

Transforman yang tumbuh kemudian diinokulasi kembali pada media LB *broth* yang telah ditambah ampisilin 100µg/mL kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C, 200 rpm, 16-18 jam. Plasmid kemudian diisolasi dengan menggunakan *Kurabo Automatic DNA isolation system*. Hasil isolasi dikarakterisasi dengan analisa restriksi dan sekuensing. Analisa restriksi dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi yang sesuai (Tabel 6.3). Plasmid yang telah direstriksi kemudian dielektroforesis dan dianalisa hasilnya.

Dilakukan analisa sekuensing untuk mengecek urutan gen yang dikloning menggunakan primer pNZ8184 (*forward* dan *reverse*) yang mengenali bagian pada vektor pNZ8184. Reaksi amplifikasi mengacu pada prosedur BigDye Terminator V3.1 (Thermo Fisher). Akhirnya produk PCR dipurifikasi dengan menggunakan kolom (Edge Bio Gel Filtration) kemudian disekuensing.

6.2.7.2. Transformasi vaksin pNZSec, pNZLOX-1, pNZGFP-LOX-1, dan pNZGFP ke dalam sel *L. lactis* NZ9000

Proses transformasi dilakukan untuk 4 set bakteri, yaitu *L. lactis* NZ9000 yang ditransformasikan dengan pNZSec, pNZLOX-1, pNZGFP-LOX-1, dan pNZGFP. Sebanyak 100-500 ng plasmid dicampurkan dengan 40 µL sel *L. lactis*

NZ9000 kompeten (diberikan oleh Takeshi Shimosato Ph.D., Laboratorim Molekular Biologi, Fakultas Agrikultur, Universitas Shinshu, Nagano, Jepang).

Campuran plasmid dan sel kompeten dielektroporasi dengan menggunakan Gene Pulser X Cell (Biorad) pada kondisi 2000V, 25 μ F, 200 Ω kemudian segera ditambahkan 1 mL media GM17 SOC dan campuran diinkubasi di es selama 5 menit. Selanjutnya sel dipulihkan dengan melakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 1,5-2 jam. Sebanyak 100 μ L sel hasil inkubasi disebar pada media GM17 Agar (M17 Agar (BD Difco TM) +10% glukosa (Wako)) yang telah disuplementasi dengan kloramfenikol (Nalacai Tesque, Inc) 10 μ g/mL sebagai media seleksi dan dilakukan inkubasi selama 24-48 jam.

6.2.7.3. Induksi ekspresi LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1

Ekspresi gen LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1 dilakukan dengan induksi nisin pada kultur bakteri *L. lactis*. Kultur bakteri yang telah ditumbuhkan semalam pada suhu 30°C pada media GM17 (media M17 Broth (BD Difco TM) + glukosa 10%+ kloramfenikol 10 μ g/mL) ditambahkan pada media GM17 segar kemudian dilakukan inkubasi kembali pada suhu 30°C hingga tercapai OD₆₀₀=0,4 (1-1,5 jam).

Selanjutnya ditambahkan nisin (MoBiTec) (1,25ng/mL) pada kultur bakteri dan dilakukan inkubasi kembali selama 3 jam. Sel dipanen dengan menggunakan sentrifugasi (8000xg, 5 menit, 4°C).

6.2.7.4. Isolasi dan verifikasi ekspresi protein GFP, GFP-LOX-1, dan LOX-1 rekombinan dengan metode Western Blot.

Sel hasil panen dipecah dengan menggunakan metode sonikasi (Bioruptor) sementara protein ekstraselular (supernatan) dikoleksi dengan menggunakan asam tri-kloroasetat/ *Tri-chloroacetic acid* (TCA) (Wako) 100%. Supernatan yang mengandung protein ekstraselular sebanyak 1.500 μ L ditambah dengan 300 μ L

TCA 100% kemudian divorteks dan diinkubasi di es selama 3 jam. Setelah inkubasi, campuran disentrifugasi (15.000 rpm, 5 menit, 4°C) kemudian supernatan dibuang. Pada *pellet* ditambahkan 400 µL aseton dingin kemudian campuran divorteks dan disentrifugasi (15.000 rpm, 5 menit, 4°C) kembali. Supernatan dibuang dan *pellet* ditambah dengan 400 µL aseton dingin kemudian campuran divorteks dan disentrifugasi kembali (15.000 rpm, 5 menit, 4°C). Setelah supernatan dibuang, *pellet* dikeringkan (55°C) kemudian pada *pellet* ditambahkan 100 µL NaOH 0,05 M dan 100 µL sampel buffer. Sampel kemudian dipanaskan 95°C selama 10 menit dan dielektroforesis.

Untuk mengisolasi protein intraselular dilakukan 5 x sonikasi, masing-masing selama 30 detik. Sampel hasil sonikasi disentrifugasi (15.000 rpm, 5 menit, 4°C) ditambah sampel buffer, dipanaskan pada suhu 95°C selama 10 menit, dan dielektroforesis.

Elektroforesis dilakukan dengan arus konstan 200mA/gel selama 1,5 jam. Protein pada gel ditransfer pada membran dengan menggunakan iBlot transfer (Invitrogen) dengan kekuatan 20V selama 7 menit. Membran dicuci dengan PBST selama 3 x 5 menit kemudian dilakukan *blocking* dengan campuran susu skim dalam buffer (Block Ace, DS Pharma Biomedical) selama 1 jam pada suhu ruang. Membran dicuci dengan PBST 3 x 5 menit kemudian ditambahkan antibodi primer anti-his (Qiagen) 1: 2000 dalam Can Get Solution 1 (Toyobo) selama 1 jam pada suhu ruang. Membran dicuci dengan PBST selama 3 x 5 menit kemudian ditambahkan antibodi sekunder HRP Mouse IgG (GE Healthcare) 1: 2000 dalam Can Get Solution 2 (Toyobo) selama 30 menit pada suhu ruang. Membran dicuci dengan PBST selama 3x 10 menit. Untuk pewarnaan ditambahkan substrat

(Immobilon Western Millipore) kemudian pita yang terbentuk diamati dengan Image Quant LAS 4000 mini, GE (*chemiluminesce*).

Ekspresi LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1 juga ditentukan dengan pengamatan di bawah cahaya fluoresensi (Image Quant LAS 4000 mini, GE). Untuk menentukan klon dengan ekspresi LOX-1 yang paling tinggi dilakukan *screening* pada 96 klon. *Screening* ekspresi LOX-1 dilakukan dengan melihat ekspresi GFP yang paling terang pada kultur *L. lactis* pNZGFP-LOX-1 yang diinduksi dengan nisin.

6.2.7.5. Perlakuan hewan coba SHR-SP

Hewan percobaan tikus jantan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 18 ekor dibagi menjadi 2 kelompok penelitian menggunakan metode rancangan acak kelompok dengan jumlah 9 ekor untuk masing-masing kelompok. Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (setiap kandang berisi maksimal 3 ekor tikus). Tikus diaklimatisasi selama 7 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dalam kondisi percobaan. Selama masa aklimatisasi, tikus sudah dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Selama masa aklimatisasi dan masa vaksinasi tikus diberikan standar diet normal. Pada saat penelitian berlangsung, minuman diberikan secara *ad libitum*. Sekam diganti setiap minggu sekali. Vaksinasi diberikan 3 kali dengan jeda 2 minggu. Setiap kali vaksinasi dilakukan selama 3 hari berturut-turut (hari ke 1-3, 14-16, dan 28-30) dengan vaksin sejumlah 1×10^{10} CFU bakteri *L. lactis* sesuai kelompoknya. Setelah masa vaksinasi, tikus diberi diet tinggi lemak selama 2 minggu. Satu minggu setelah vaksinasi terakhir, sampel darah tikus diambil melalui ekor untuk diukur kadar antibodi IgG anti-LOX-1. Perlakuan terhadap semua tikus dilakukan bersamaan selama 63 hari. Pada akhir penelitian, semua tikus dieutanasia untuk

diambil jaringan *abdominal mesenteric artery* sebagai bahan pemeriksaan ekspresi LOX-1 dan deposisi lipid. Sampel darah tikus diambil dari *superior mesenteric artery* untuk ditentukan kadar antibodi IgG anti LOX-1 dan profil lipidnya.

6.2.7.5. Preparasi dan administrasi vaksin LOX-1

Kultur *L. lactis* NZ9000 dengan pNZ8184Sec#2 GFP-LOX-1 (pNZGFP-LOX-1) dan *L. lactis* NZ9000 dengan pNZ8184Sec#2 GFP (pNZGFP) yang disimpan dalam stok gliserol digores pada media M17 Agar yang telah disuplementasi dengan 10% glukosa (GM17 Agar) dan ditambah kloramfenikol (konsentrasi akhir 10 µg/mL). Agar diinkubasi pada suhu 30°C. Dipilih 5 koloni yang tumbuh dari masing-masing bakteri kemudian diinokulasikan kembali ke dalam 10 mL media M17 Broth + 10% glukosa (GM17 Broth) yang mengandung kloramfenikol (10µg/mL) dan diinkubasi pada suhu 30°C semalam (18 jam). Sebanyak 5% kultur semalam (3,75 mL) dipindahkan pada media GM17 baru (71,25 mL) sehingga diperoleh total kultur sejumlah 75 mL dan diinkubasi kembali 1,5-2 jam hingga OD₆₀₀ = 0,4. Setelah nilai OD₆₀₀ tercapai, ditambahkan nisin pada kultur dengan konsentrasi akhir 1,25 ng/mL dan dilakukan inkubasi kembali 3-4 jam hingga diperoleh OD₆₀₀=1,9-2,0. Setelah diperoleh OD yang diinginkan dilakukan konfirmasi ekspresi protein LOX-1 dan GFP dengan melakukan pengamatan di bawah fluoresensi. Kultur yang dipilih disentrifugasi pada kecepatan 8000 x g, 5 menit, 4°C kemudian dicuci dengan saline steril. Setelah pencucian dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 8000 x g, 5 menit, 4°C, kultur diresuspensi kembali dengan saline steril kemudian diberikankan ke tikus melalui rute oral dengan menggunakan sonde sebanyak 200µL per tikus yang mengandung 1x10¹⁰ CFU *L. lactis*. Penentuan jumlah CFU dilakukan dengan

melakukan pengenceran bertingkat dan membuat kurva regresi antara jumlah koloni yang tumbuh OD₆₀₀.

6.2.7.6. Pengukuran kadar IgG antiLOX-1 dengan metode ELISA

Sumuran pada *microplate* dilapis dengan 30 μ L (5 μ g/mL) LOX-1 tikus rekombinan dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. *Microplate* dicuci 3x dengan PBS dan dilakukan *blocking* dengan 20% *Immunoblot Solution* (DS Pharma) dalam PBS 1 jam pada suhu ruang. *Microplate* dicuci dengan PBS sebanyak 3x.

Plasma darah tikus yang telah diencerkan dengan perbandingan 1:10, 1:100, 1:1000, dan 1: 10.000, masing-masing sebanyak 20 μ L dan dilakukan inkubasi 1 jam pada suhu ruang. *Microplate* dicuci dengan PBS sebanyak 3x. Antibodi primer anti IgG dan IgM yang berlabel (1:2000 dalam 1% BSA) ditambahkan kemudian *plate* diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. *Microplate* dicuci 5x dengan PBS. Ditambahkan substrate TMB solution (Biorad) kemudian dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam kondisi gelap. Reaksi dihentikan dengan penambahan asam sulfat (2M) dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450 nm.

6.2.7.7. Pengorbanan hewan coba dan koleksi jaringan

Setelah diberikan diet tinggi lemak dan saline selama 2 minggu, tikus dipuasakan selama semalam. Sebelum dikorbankan tekanan darah hewan coba diukur dengan menggunakan metode *tail cuff*. Pembedahan diawali dengan pemberian *isoflurane* melalui inhalasi. Setelah tikus tidak sadar, tikus difiksasi dengan jarum di atas papan bedah. Pembedahan dilakukan dengan membuka dinding abdomen dan *thorax*. Dilakukan reperfusi jantung dengan menggunakan normal saline. Untuk koleksi *abdominal mesenteric artery* usus halus dan usus besar tikus diambil, jaringan *abdominal mesenteric artery* dipisahkan dari lipid

yang menempel dengan hati-hati, dibilas dengan normal saline dan disimpan dalam paraformaldehida 4% selama 18-24 jam. Sampel darah diambil untuk penentuan profil lipid, kadar elektrolit, dan kadar antibodi serum. Profil lipid ditentukan dengan menggunakan Bio Majesty Series JCA-BM6070 (JEOL) dan reagen yang tertera pada Tabel 6.4. Kadar antibodi ditentukan dengan menggunakan metode ELISA dengan prosedur yang sama pada sub-bab 6.2.7.6.

Tabel 6.4. Peralatan dan reagen yang digunakan dalam penentuan profil lipid dan kadar elektrolit serum

No	Parameter	Reagen
1.	T-CHO (kolesterol total)	Determiner L TC II (Kyowa Medex Co.LTD)
2.	HDL (kolesterol HDL)	Cholestest N HDL (SEKISUI MEDICAL CO.LTD)
3.	LDL (Kolesterol LDL)	Cholestest N LDL (SEKISUI MEDICAL CO.LTD)
4.	TG (trigliserida)	Quick Auto Neo TG II (A) (SHINO-TEST CORPORATION)
5.	PL (fosfolipid)	L-type wako Phospholipids (Wako Pure Chemical Industries,Ltd)

6.2.7.8. Pewarnaan jaringan *abdominal mesenteric artery* dengan Oil Red O untuk penentuan deposisi lipid

Jaringan *abdominal mesenteric artery* dicuci dengan larutan di bawah ini:

- Milli Q (2 menit)
- Isopropil alkohol 60 % (2 menit)
- Oil Red O (30 menit)
- Isopropil alkohol 60 % (3 x 2 menit)
- Isopropil alkohol 30 % (2 menit)
- Milli Q (2 menit)
- Paraformaldehida 4%

Pengamatan jaringan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 x untuk pengamatan deposisi lipid.

6.2.7.9. Pengolahan dan analisis data

Hasil pemeriksaan parameter uji kelompok kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program IBM SPSS 20 (*Statistical Package for the Social Sciences*) dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

1. Untuk menguji normalitas distribusi sampel dilakukan uji menggunakan Kolmogorov-Smirnov *test*. Nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan distribusi data yang tidak normal, sedangkan nilai signifikansi $> 0,05$ menunjukkan distribusi data yang normal. Jika distribusi data tidak normal, maka dilakukan transformasi data untuk menormalkan.
2. Untuk menguji homogenitas sampel dilakukan uji kesamaan ragam menggunakan *Levene test homogeneity of variances*. Nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan varian data yang tidak homogen, sedangkan nilai signifikansi $> 0,05$ menunjukkan varian data yang homogen. Jika varian data tidak sama atau tidak homogen, maka dilakukan transformasi data untuk menghomogenkan sehingga didapatkan varian data sama atau homogen
3. Uji Independent T-test sampel digunakan untuk menganalisis apakah terdapat perbedaan hasil yang bermakna antar masing-masing kelompok penelitian dengan melihat nilai p , dengan nilai $p < 0,05$ menggambarkan adanya perbedaan hasil yang bermakna antar kelompok.

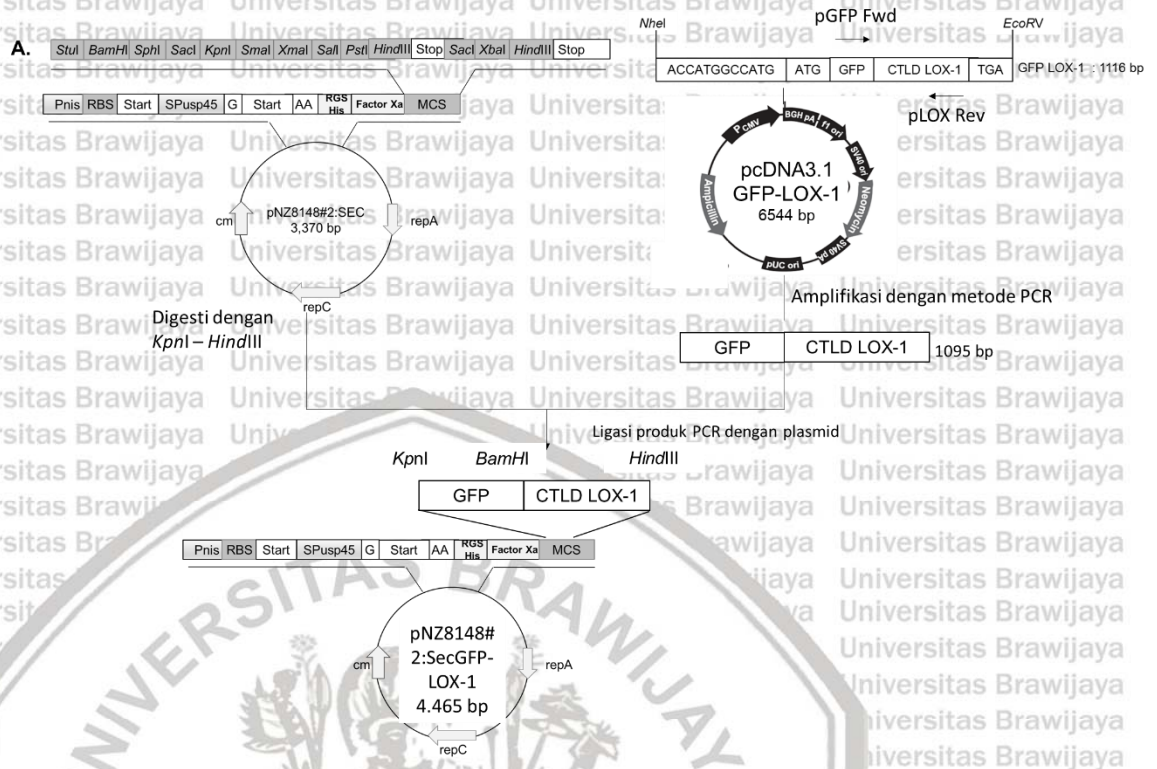
Hasil analisa telah dikonsultasikan dengan Achmad Efendi, SSi., MSc.PhD dari Program Studi S1 Statistika, Jurusan Matematika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

6.3. Hasil Penelitian dan Pengolahan Data

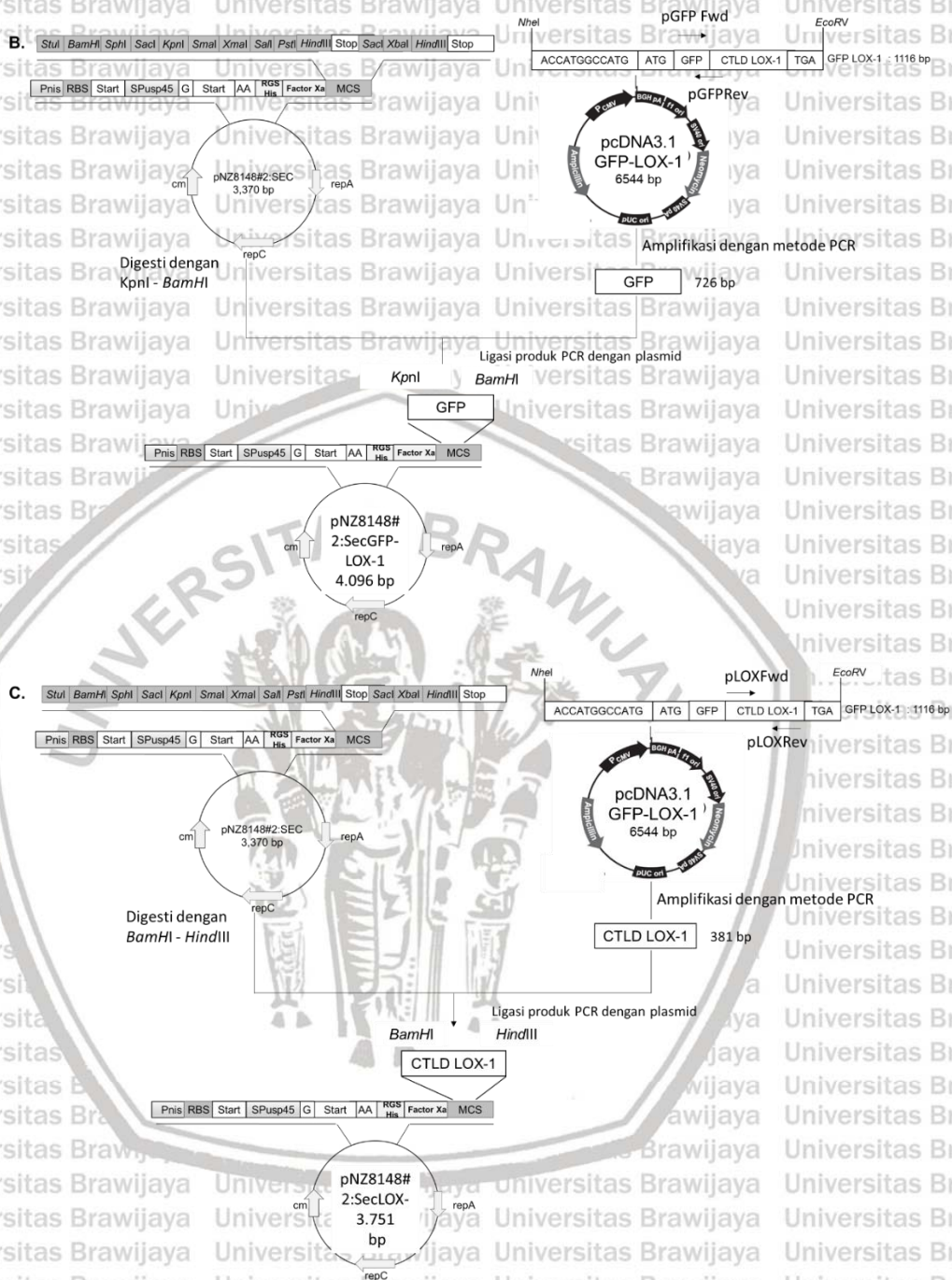
6.3.1. Construct pNZLOX-1 dan pNZGFP-LOX-1

Gen penyandi LOX-1 dan GFP diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik yang telah ditambahkan dengan sisi pengenalan enzim restriksi yang sesuai, *construct* yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 6.1. Produk PCR berupa gen sisipan GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1 yang dianalisa dengan elektroforesis agarosa dapat dilihat pada Gambar 6.2.

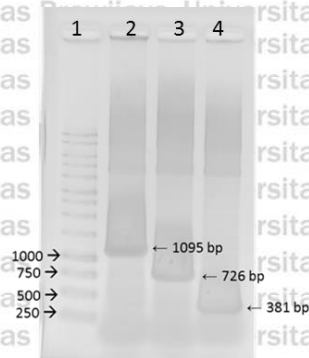
Selanjutnya gen disubklon ke *E. coli* Top10 dengan menggunakan pCRTOPO2.1. Hasil analisa restriksi pTOPO-LOX-1, pTOPO-GFP-LOX-1, pTOPO-GFP dapat dilihat pada Gambar 6.3. Pada tahap selanjutnya dilakukan kloning gen penyandi GFP, GFP-LOX-1, dan LOX-1 pada pNZ8148 sebagai vektor yang dikenali oleh sistem ekspresi *L. lactis*. Sebelum ditransformasikan ke *L. lactis*, dilakukan transformasi pada *E. coli* MC1061 sebagai inang perantara. Gen sisipan GFP, GFP-LOX-1, dan LOX-1 diligasikan dengan pNZ8148 linier dan ditransformasikan pada *E. coli* MC1061 dengan metode elektroporasi. Transforman yang tumbuh kembali dikarakterisasi dengan analisa restriksi (Gambar 6.4) dan sekuensing (Lampiran 9).



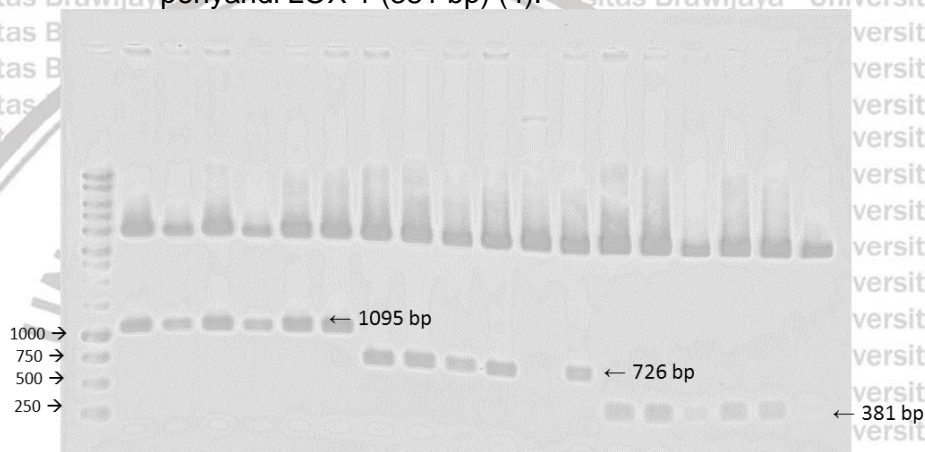
Gambar 6.1. Pembuatan Construct pNZ8148 dengan gen sisipan GFP-LOX-1 (A) /GFP(B) /LOX-1 (C) . Gen penyandi GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1 disisipkan dengan menambah situs pengenalan enzim restriksi *KpnI* dan *HindIII* (untuk gen sisipan GFP dan GFP-LOX-1) serta situs pengenalan enzim restriksi *BamHI* dan *HindIII* untuk gen sisipan LOX-1 (Sumber: pNZ8148Sec#2: MobiTec, dengan modifikasi dari Shigemori, *et al.*, 2015)



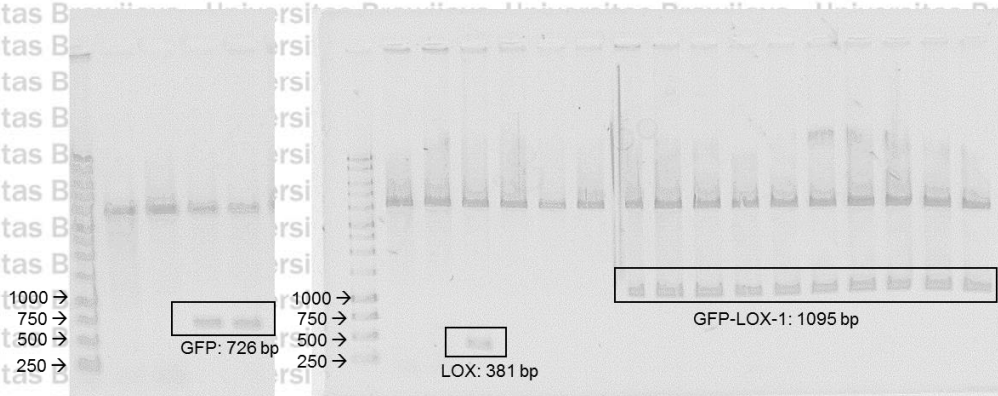
Gambar 6.1. Pembuatan Construct pNZ8148 dengan gen sisipan GFP-LOX-1 (A)/GFP(B)/LOX-1(C). Gen penyandi GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1 disisipkan dengan menambah situs pengenalan enzim restriksi KpnI dan HindIII (untuk gen sisipan GFP dan GFP-LOX-1) serta situs pengenalan enzim restriksi BamHI dan HindIII untuk gen sisipan LOX-1 (Sumber: pNZ8148Sec#2: MobiTec, dengan modifikasi dari Shigemori, et al., 2015)



Gambar 6.2. Produk amplifikasi gen penyandi GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1 dengan ukuran yang sesuai. DNA ladder 1 kb (1), gen penyandi GFP-LOX-1 (1085 bp) (2), gen penyandi GFP (726 bp) (3), gen penyandi LOX-1 (381 bp) (4).



Gambar 6.3. Hasil dan analisa restriksi pTOPO-LOX-1, pTOPO-GFP-LOX-1, pTOPO-GFP (B). Analisa restriksi dengan enzim *KpnI* dan *HindIII* menunjukkan hasil restriksi berupa gen sisipan GFP-LOX-1 berukuran 1095 bp (line 2-7) dan GFP berukuran 726 bp (line 8-13) sementara pemotongan dengan enzim *BamHI* dan *HindIII* menunjukkan adanya gen sisipan LOX-1 berukuran 381 bp (line 14-19). Line 1 menunjukkan DNA marker 1 kb.



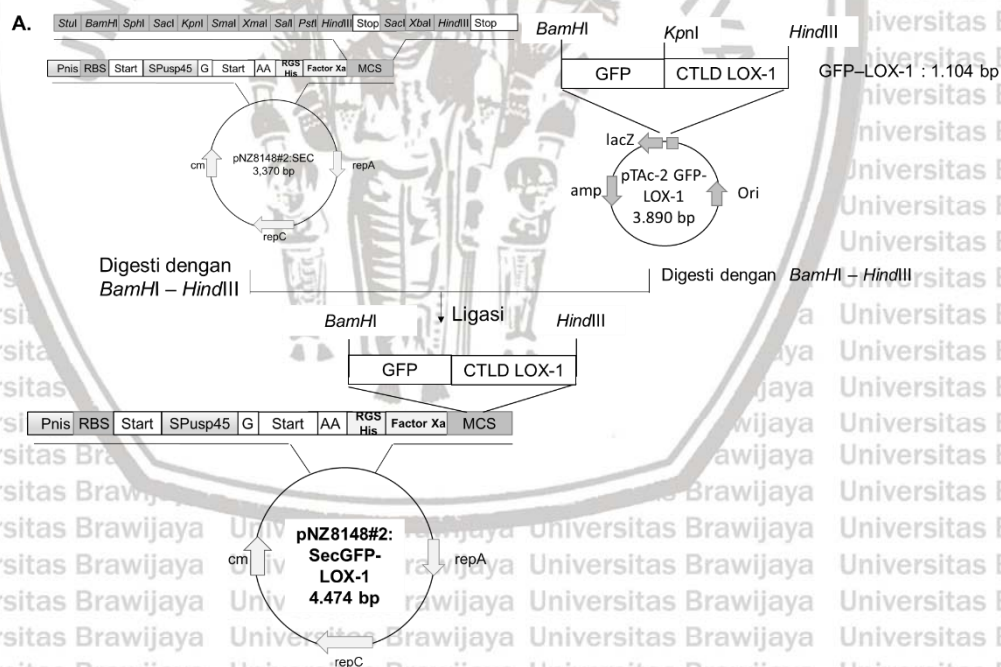
Gambar 6.4. Hasil analisa restriksi pNZGFP-LOX-1, pNZGFP, dan pNZLOX-1. Analisa restriksi dengan menggunakan enzim restriksi *KpnI* dan *HindIII* menunjukkan koloni yang mengandung pNZGFP-LOX-1 (gen sisipan berukuran 1095 bp) dan pNZGFP (gen sisipan berukuran 726 bp); sementara analisa restriksi dengan enzim restriksi *BamHI* dan *HindIII* menunjukkan koloni yang mengandung pNZLOX-1 (gen sisipan berukuran 381 bp). Beberapa koloni yang tumbuh pada media seleksi dengan antibiotik tidak menunjukkan adanya gen sisipan yang menunjukkan terjadinya *self-ligation* pada plasmid.

Hasil analisa dengan sekuensing menunjukkan bawa terjadi mutasi pada gen penyandi GFP dan GFP-LOX-1. Mutasi terjadi pada beberapa lokasi sekaligus dan menyebabkan terjadinya perubahan asam amino dengan perbedaan sifat sehingga klon tersebut tidak dapat digunakan (Gambar 6.5). Mutasi dapat terjadi secara spontan dalam proses perpanjangan atau amplifikasi gen.

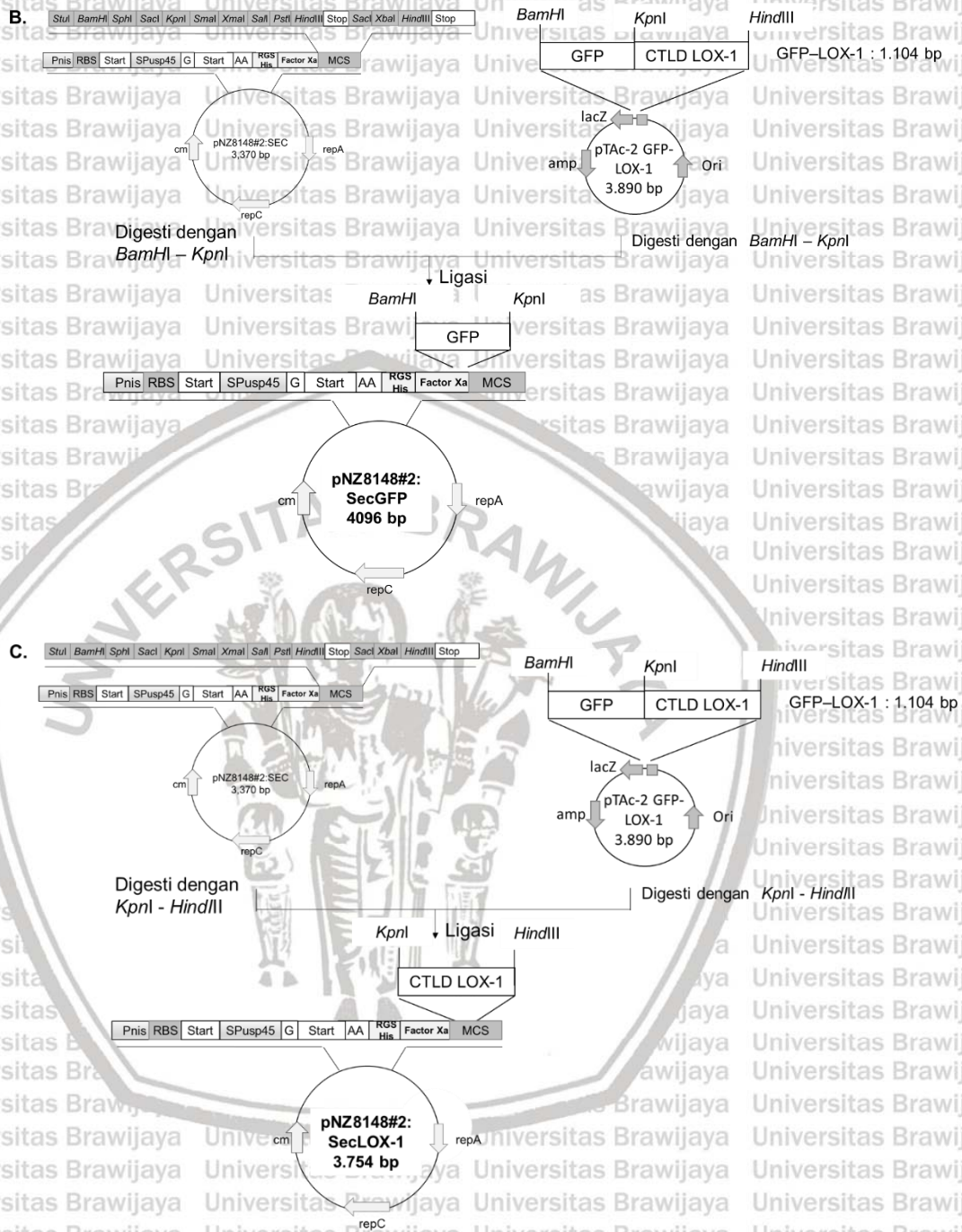


Gambar 6.5. Hasil analisa sekuensing menunjukkan terjadinya mutasi pada gen penyandi GFP-LOX-1 (A) dan GFP (B). Mutasi tersebut mengakibatkan terjadinya perubahan asam amino sehingga klon tidak dapat digunakan dalam proses vaksinasi.

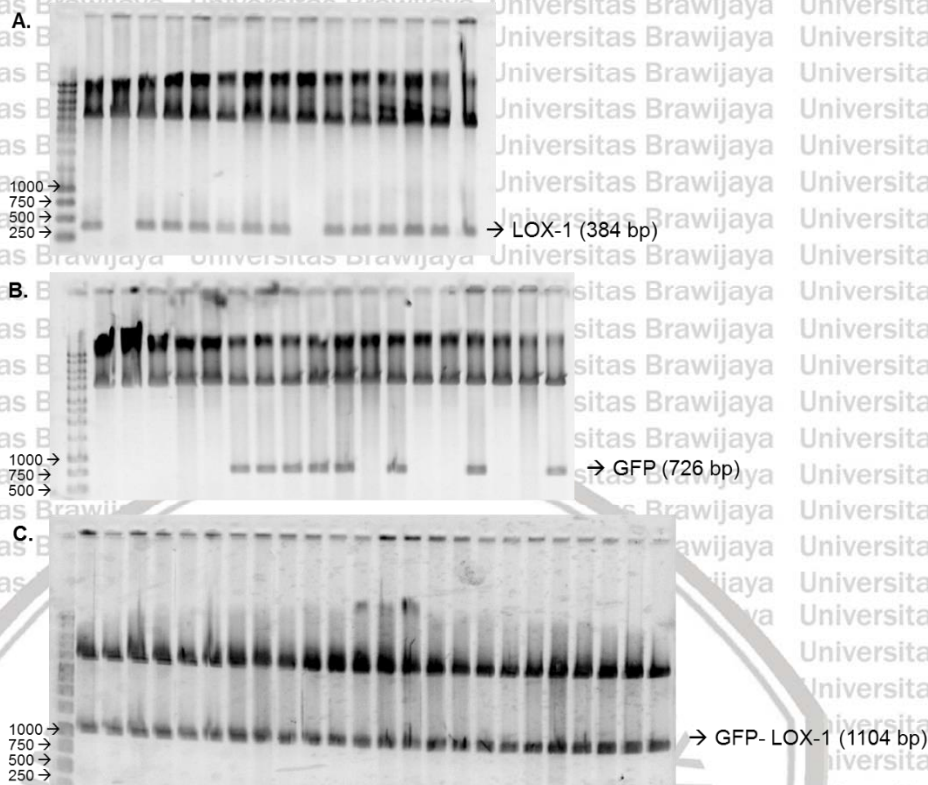
Karena adanya mutasi spontan yang terjadi, selanjutnya dilakukan sintesis gen baru untuk penyandi GFP-LOX-1 dengan kodon yang telah dioptimasi untuk ekspresi pada *L. lactis* selaku sel inang yang dituju. Construct plasmid pNZ8148 dengan sisipan gen penyandi GFP dan GFP LOX-1 dapat dilihat pada Gambar 6.6. Gen yang disintesa direligasikan dengan pNZ8148.Sec#2 yang merupakan plasmid pembawa yang sesuai untuk *L. lactis* kemudian plasmid disubklon ke *E. coli* MC10661 dan dikonfirmasi kembali kebenaran plasmidnya dengan menggunakan analisa restriksi (Gambar 6.8) dan sekuensing (Lampiran 10). Analisa restriksi dan sekuensing menunjukkan kebenaran identitas plasmid tanpa adanya mutasi sehingga plasmid dapat diklon ke *L. lactis* NZ9000 sebagai pembawa vaksin.



Gambar 6.6 Construct pNZ8148 dengan gen sisipan GFP-LOX-1 (A)/GFP (B)/LOX-1 (C). Gen penyandi GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1 yang telah disesuaikan kodonnya untuk diekspresikan pada *L. lactis* disisipkan dengan menambah situs pengenalan enzim restriksi *Bam*HI dan *Hind*III (untuk gen sisipan GFP-LOX-1), situs pengenalan enzim restriksi *Bam*HI dan *Kpn*I (untuk gen sisipan GFP), serta situs pengenalan enzim restriksi *Kpn*I dan *Hind*III (untuk gen sisipan LOX-1) (Sumber: pNZ8148Sec#2: MobiTec, dengan modifikasi dari Shigemori, et al., 2015)



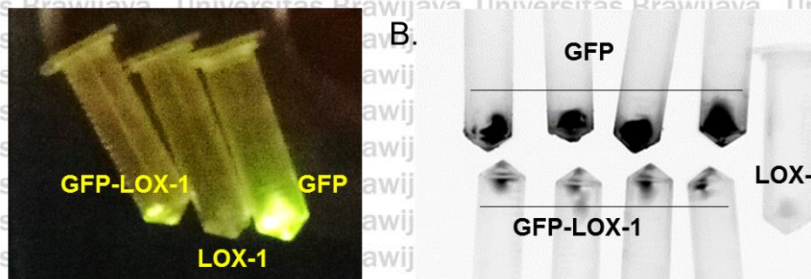
Gambar 6.6 Construct pNZ8148 dengan gen sisipan GFP-LOX-1 (A)/GFP (B)/LOX-1 (C). Gen penyandi GFP-LOX-1, GFP, dan LOX-1 yang telah disesuaikan kodonnya untuk diekspresikan pada *L. lactis* disisipkan dengan menambah situs pengenalan enzim restriksi *Bam*HI dan *Hind*III (untuk gen sisipan GFP-LOX-1), situs pengenalan enzim restriksi *Bam*HI dan *Kpn*I (untuk gen sisipan GFP), serta situs pengenalan enzim restriksi *Kpn*I dan *Hind*III (untuk gen sisipan LOX-1) (Sumber: pNZ8148Sec#2: MobiTec, dengan modifikasi dari Shigemori, *et al.*, 2015)



Gambar 6.7. Hasil analisa restriksi pNZGFP-LOX-1, pNZGFP, dan pNZLOX-1. Analisa restriksi dengan menggunakan enzim restriksi menunjukkan koloni yang mengandung gen sisipan LOX-1 (A), GFP (B), dan GFP-LOX-1 (C). Beberapa koloni yang tumbuh pada media seleksi dengan antibiotik tidak menunjukkan adanya gen sisipan yang menunjukkan terjadinya *self-ligation* pada plasmid.

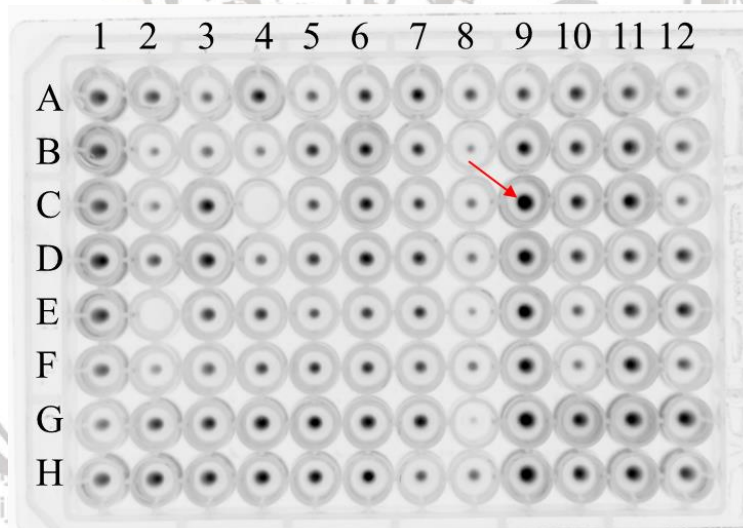
6.3.2. LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1 dapat diekspresikan oleh *L. lactis* NZ900 dengan induksi nisin

Uji ekspresi dapat dilakukan dengan melakukan pengamatan secara langsung di bawah cahaya fluoresensi. Hasil pengamatan pada Gambar 6.8 menunjukkan bahwa koloni *L. lactis* dengan pNZGFP dan pNZGFP-LOX-1 yang telah diinduksi dengan nisin dapat berpendar di bawah cahaya fluoresen, sementara koloni *L. lactis* yang mengandung pNZLOX-1 tidak berpendar.



Gambar 6.8 Koloni *L. lactis* dengan pNZGFP-LOX-1 dan pNZGFP berpendar di bawah pengamatan cahaya fluoresen sementara koloni *L. lactis* dengan pNZLOX-1 tidak menunjukkan pendaran.

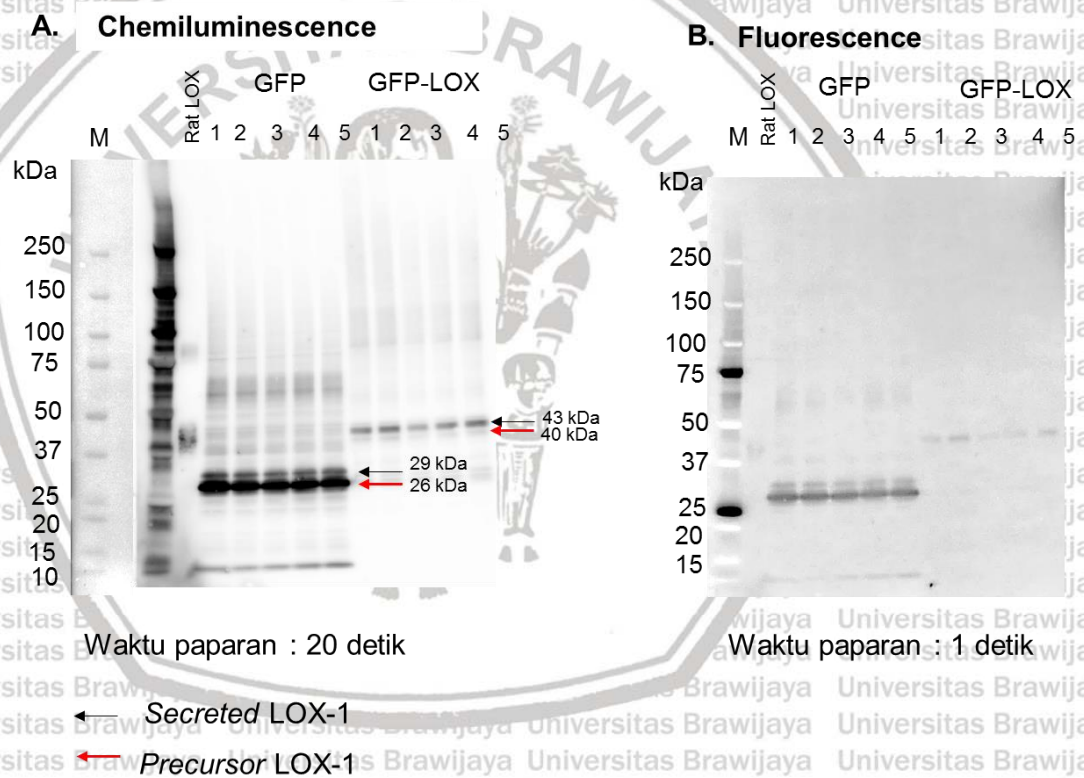
Screening dilakukan untuk menentukan koloni *L. lactis* dengan pNZGFP-LOX-1 dengan pendaran yang paling maksimal untuk kemudian digunakan dalam vaksinasi (Gambar 6.9). Dari hasil screening dipilih koloni C9 untuk selanjutnya digunakan dalam vaksinasi.



Gambar 6.9. Screening koloni *L. lactis* dengan pNZGFP-LOX-1 dengan pendaran yang paling tinggi. Hasil pengamatan secara visual menunjukkan koloni nomor C9 memiliki pendaran yang paling tinggi dibandingkan koloni lain.

Analisa ekspresi protein GFP dan GFP-LOX-1 juga dilakukan dengan metode *Western Blot* dengan menggunakan antibodi anti-His. Antibodi ini digunakan karena dapat mengenali protein berlabel his, sedangkan protein GFP

dan GFP-LOX-1 terekspresi sebagai protein fusi dengan label his sehingga dapat dikenali oleh antibodi anti-his. Hasil analisa dengan *Western Blot* dapat dilihat pada Gambar 6.10. Protein GFP dan GFP-LOX-1 masing-masing teramati dalam dua pita yang mewakili bentuk *precursor* dan *secreted* protein. Protein *precursor* memiliki ukuran lebih besar karena mengandung *signal peptide* sedangkan bentuk *secreted* memiliki ukuran yang lebih kecil. Fenomena ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang menggunakan plasmid dan sistem ekspresi *L. lactis* yang sama (Shigemori, *et al.*, 2015).



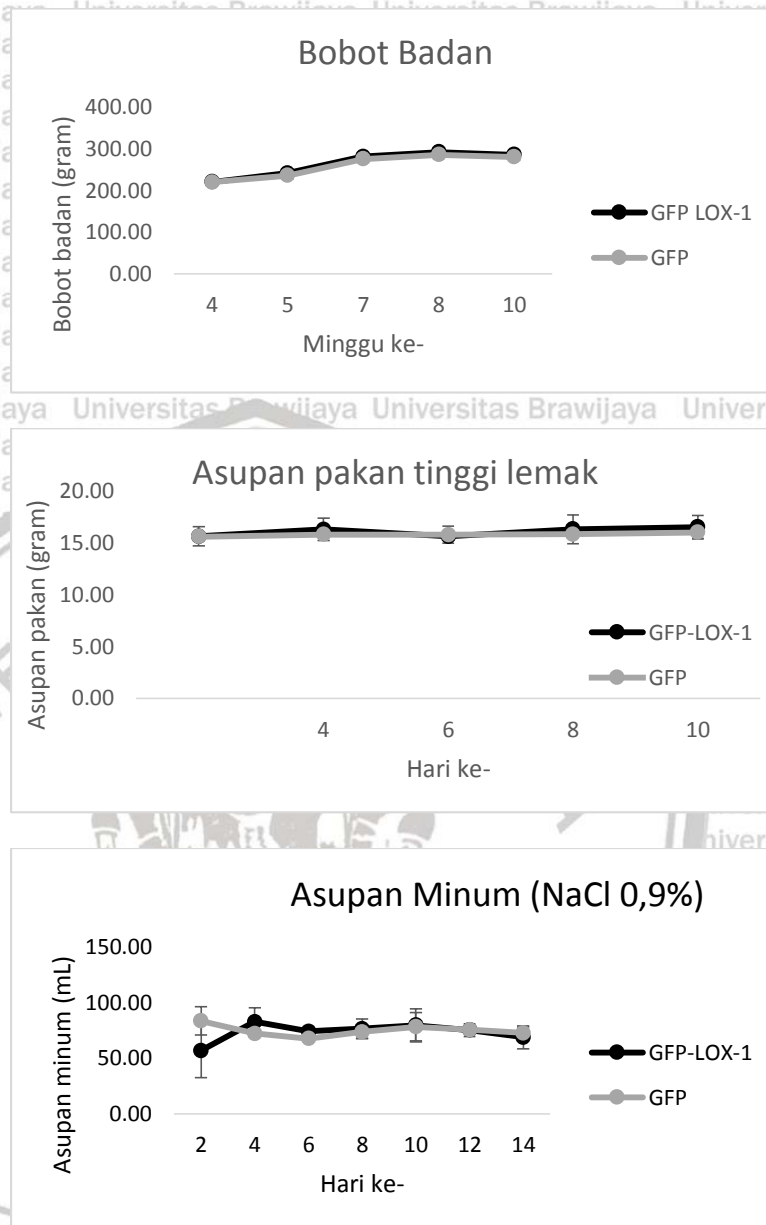
Gambar 6.10. Hasil analisa ekspresi protein GFP dan GFP-LOX-1 pada *L. lactis* NZ9000 dengan metode *Western Blot* dengan antibodi anti-His dengan metode *chemiluminescence* dan *fluorescence*. Protein GFP dan GFP-LOX-1 terekspresi dalam bentuk *precursor* (panah merah) dan *secreted* (panah hitam). GFP *precursor* dan *secreted* berukuran masing-masing sekitar 29 dan 26 kDa sementara GFP-LOX-1 *precursor* dan *secreted* masing-masing berukuran sekitar 40 dan 43 kDa.

6.3.3. Pengaruh vaksinasi LOX-1 rekombinan dengan pembawa *L. lactis* pada bobot badan dan asupan diet

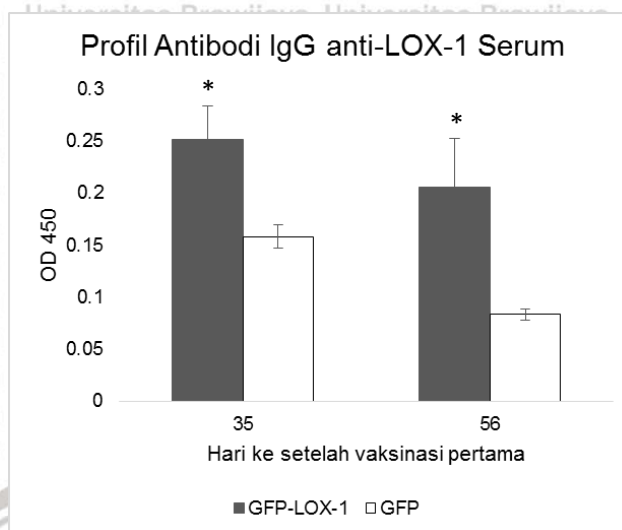
Vaksinasi LOX-1 rekombinan tidak mempengaruhi bobot badan hewan coba selama perlakuan (Gambar 6.11.A). Demikian pula vaksinasi LOX-1 rekombinan tidak mempengaruhi asupan pakan diet tinggi lemak dan saline normal selama perlakuan (Gambar 6.11.B dan 6.11.C). Tidak ada perbedaan signifikan antara bobot badan, asupan pakan dan minum antara kedua kelompok selama perlakuan.

6.3.4. Vaksinasi LOX-1 rekombinan dengan pembawa *L. lactis* meningkatkan kadar IgG serum anti-LOX-1

Untuk menentukan pengaruh vaksinasi LOX-1 rekombinan terhadap respon imun dilakukan pengukuran terhadap kadar IgG serum anti-LOX-1 satu minggu setelah vaksinasi terakhir dan pada akhir perlakuan. Hasil pengukuran dengan metode ELISA menunjukkan bahwa vaksinasi LOX-1 meningkatkan kadar IgG anti-LOX-1 secara signifikan (Gambar 6.12, Tabel 6.9.) pada hari ke-35 ($p = 0,046$) (Lampiran 11) dan ke- 56 setelah vaksinasi pertama ($p = 0.039$) (Lampiran 12). Kadar antibodi IgG anti-LOX-1 pada serum tikus perlakuan menurun pada hari ke-56 setelah vaksinasi pertama, namun masih lebih tinggi dibandingkan daripada kadar antibodi pada tikus kontrol.



Gambar 6.11. Perbandingan bobot badan (A) asupan pakan (B) dan minum (C) tikus kelompok kontrol (GFP) dan kelompok perlakuan (GFP-LOX-1). Bobot badan ditentukan mulai minggu ke-4 hingga minggu ke-10 perlakuan. Asupan pakan dan minum ditentukan selama diberikan diet tinggi lemak. Tidak ada perbedaan signifikan antara bobot badan, asupan pakan dan minum kedua kelompok selama perlakuan.



Gambar 6.12. Perbandingan absorbansi IgG anti-LOX-1 pada tikus kelompok perlakuan yang divaksinasi dengan *L. lactis* pNZGFP-LOX-1 dengan tikus kelompok kontrol yang divaksinasi dengan *L. lactis* pNZGFP. Serum diambil pada hari ke-35 dan ke-56 setelah vaksinasi pertama dan diencerkan 1:10 untuk digunakan dalam penghitungan. Keterangan: * = $p < 0,05$

6.3.5. Vaksinasi LOX-1 rekombinan dengan pembawa *L. lactis* mencegah deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP

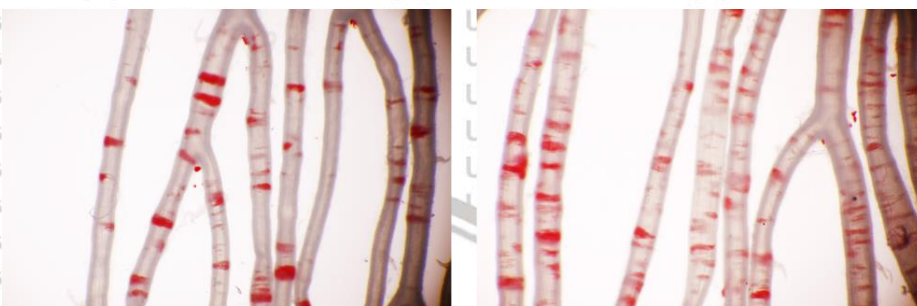
Deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* diidentifikasi dengan menggunakan metode pengecatan Oil Red O. Titik-titik merah yang terbentuk pada dinding pembuluh darah menunjukkan adanya deposisi lipid (Gambar 6.13, Lampiran 13). Hasil penghitungan jumlah titik deposisi lipid menunjukkan bahwa vaksinasi LOX-1 diduga mampu mencegah pembentukan area deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP walaupun tidak signifikan secara statistik ($p = 0,232$) (Lampiran 14).

6.3.7. Vaksinasi LOX-1 rekombinan dengan pembawa *L. lactis* tidak berpengaruh pada profil lipid SHR-SP

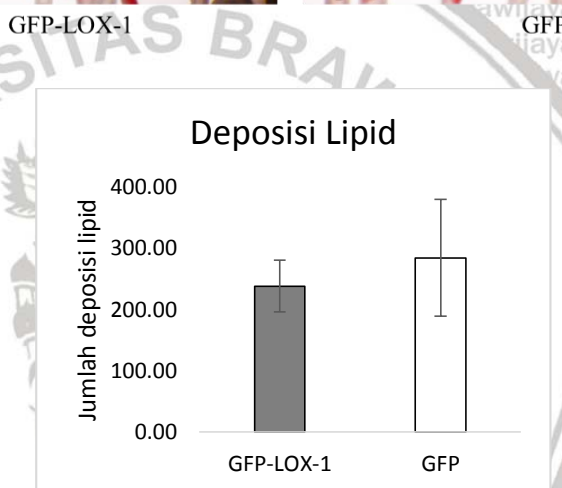
Vaksinasi LOX-1 tidak mempengaruhi profil lipid serum pada tikus kelompok kontrol GFP dan kelompok perlakuan GFP-LOX-1 (Tabel 6.5). Analisa statistika

pada kadar kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL, trigliserida, dan fosfolipid tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok (Lampiran 15).

A.



B.



Gambar 6.13. Deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* yang dicat dengan *Oil red O* diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 4x (A) serta perbandingan jumlah area deposisi lipid antara kelompok perlakuan (GFP-LOX-1) dan kelompok kontrol (GFP) (B).

Tabel 6.5. Perbandingan Profil Lipid Serum tikus kelompok kontrol (GFP) dan perlakuan (GFP-LOX-1) dinyatakan dalam Mean ± SD. Keterangan: T-CHO = kolesterol total, HDL = kolesterol HDL, LDL = kolesterol LDL, TG = trigliserida, PL = fosfolipid.

	T-CHO (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	PL (mg/dL)
GFP-LOX-1	185.56 (40.98)	22.84 (1.76)	61.40 (18.68)	38.67 (5.72)	136.33 (12.21)
GFP	192.22 (48.26)	21.04 (3.05)	65.03 (20.59)	40.00 (13.64)	131.78 (15.64)
P value	0,756	0,145	0,700	0,790	0,501

6.4. Pembahasan

6.4.1. Ekspresi LOX-1 dan GFP-LOX-1 pada *L. lactis* NZ9000 dengan induksi nisin

Pada penelitian tahap II, vaksinasi LOX-1 diberikan dengan pendekatan yang berbeda, yaitu menggunakan *L. lactis* rekombinan sebagai pembawanya. *L. lactis* rekombinan berperan dalam mengekspresikan protein antigen serta sebagai pembawa yang dapat memicu sistem imun. *L. lactis* rekombinan strain NZ9000 merupakan modifikasi dari *L. lactis subsp. cremoris* MG1363 (nisin-negatif) yang telah disisipi dengan gen regulasi NisK dan NisR pada kromosomnya. Nisin yang ditambahkan ke dalam medium akan masuk ke dalam sel dan berikatan dengan NisK dan menginduksi autofosforilasi serta transfer fosfat pada NisR. Selanjutnya NisR yang teraktivasi akan menginduksi transkripsi gen di bawah regulasi promotor NisA (P_{NisA}) (de Ruyter, *et al.*, 1996; Mierau & Kleerebezem, 2005).

Penambahan 1,25 ng/ μ L nisin dapat menginduksi ekspresi protein rekombinan LOX-1, GFP dan GFP-LOX-1 dapat terekspresi dengan baik pada *L. lactis* NZ9000. Hasil ini sesuai dengan studi sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekspresi protein rekombinan maksimal dapat dicapai dengan induksi nisin sebesar 1,25 ng/ μ L dengan waktu inkubasi optimal 3-4 jam (Shigemori, *et al.*, 2013; Shigemori, *et al.*, 2012). Hasil pengamatan secara langsung di bawah cahaya fluoresensi menunjukkan pendaran yang kuat dari *pellet* sel *L. lactis* yang mengandung pNZGFP dan pNZGFP-LOX-1. Pendaran yang lebih kuat ditunjukkan oleh sel dengan pNZGFP saja dibandingkan sel dengan pNZGFP-LOX-1. Hal ini mungkin dapat disebabkan karena proses pelipatan protein LOX-1 mempengaruhi struktur GFP (Snapp, 2010). Protein fusi GFP-LOX-1 juga

memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan GFP sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama dalam proses ekspresinya.

LOX-1 rekombinan didesain sebagai protein ekstraselular dengan *signal peptide* berupa Usp45 pada plasmid pNZ8148. Walaupun demikian, analisa *Western Blot* dari isolat intraselular dan ekstraselular mampu menunjukkan adanya pita LOX-1. Analisa *Western Blot* pada isolat protein intraselular menunjukkan adanya pita LOX-1, GFP, dan GFP-LOX-1 dengan ukuran yang sesuai, yaitu sekitar 14, 26, dan 40 kDa. Analisa pada isolat ekstraselular memperlihatkan hasil yang berbeda, yaitu terdeteksinya protein GFP dengan jelas, tetapi protein LOX-1 dan GFP-LOX-1 tidak dapat terdeteksi dengan jelas. Hal ini diduga diakibatkan karena terjadinya pengikatan LOX-1 dengan membran luar bakteri. Protein LOX-1 yang telah diekspresikan ke luar sel akan terikat kembali dengan membran bakteri sehingga tidak dapat dideteksi dengan jelas pada isolat ekstraselular. LOX-1 telah diketahui berperan dalam pengikatan baik bakteri Gram negatif maupun Gram positif dengan sel endotel, sehingga berperan dalam infeksi endocarditis. LOX-1 diketahui memfasilitasi pengikatan sel endotel dengan bakteri *Stapylococcus aureus* dan *E. coli* secara *in vitro*, baik pada kondisi statis maupun non-statis. Keberadaan kation divalent pada media tidak mempengaruhi ikatan LOX-1 dengan bakteri, menunjukkan bahwa ikatan yang terbentuk bukan ikatan ionik (Shimaoka, *et al.*, 2001).

6.4.2. Vaksinasi pNZGFP-LOX-1 dengan pembawa *L. lactis* rekombinan mampu mencegah deposisi lipid pada tikus SHR-SP

Untuk menguji efektivitas pNZGFP-LOX-1 dalam mencegah aterosklerosis digunakan hewan coba tikus SHR yang merupakan model yang sesuai untuk menguji deposisi lipid. Sejak dikembangkan pertama kali oleh Okamoto *et al.*, 1963

tikus SHR banyak digunakan sebagai tikus model untuk mempelajari penyakit kardiovaskular (Okamoto & Aoki, 1963).

Studi pada level genomik menunjukkan terjadinya *quantitative trait loci* (QTL) pada berbagai lokasi pada kromosom SHR. QTL merupakan bagian dari DNA (locus) yang berkaitan dengan variasi fenotip tertentu. Studi QTL pada SHR-SP menunjukkan adanya delesi pada gen penyandi CD36 (*fatty acid translocase*), yang bertanggung jawab pada untuk berbagai gejala penyakit metabolik, meliputi dislipidemia, resistansi insulin, dan hipertensi. Studi lain menunjukkan adanya mutasi pada gen penyandi Ogn (*Osteoglycin*) yang berperan pada terjadinya hipertrofi kardiak. Selain itu juga ditemukan adanya variasi pada gen penyandi Srebf1 (*sterol regulatory element binding factor 1c isoform*) yang berkaitan dengan kelainan pada metabolisme lipid hepatic (Pravenec *et al.*, 2014; Michal Pravenec & Kurtz, 2010).

SHR-SP merupakan tikus turunan dari SHR yang memiliki kerentanan lebih tinggi terhadap terjadinya stroke (80 vs 10%) dengan hipertensi lebih parah (220-240 vs 180-200 mmHg) ketika dibandingkan dengan SHR. Insidensi stroke meningkat hingga 100% pada SHR-SP dengan pemberian diet tinggi garam (Nabika, *et al.*, 2012). SHR-SP menunjukkan deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* 2 minggu setelah pemberian diet tinggi lemak (Nakano, *et al.*, 2010). Ekspresi LOX-1 juga diketahui meningkat secara signifikan pada SHR-SP dengan kondisi hipertensi dan hiperkolesterolemia (Hamakawa, *et al.*, 2003; Nakano, *et al.*, 2010). Peningkatan ekspresi LOX-1 terkait dengan deposisi ox-LDL pada dinding vaskular. LOX-1 meningkatkan retensi ox-LDL pada dinding vaskular serta meningkatkan permeabilitas ox-LDL ke dalam vaskular (Nakano *et al.*, 2010).

Deposisi lipid pada dinding vaskular *abdominal mesenteric artery* terkait dengan tingkat deposisi lipid pada area arteri koroner dan renal. Walaupun deposisi lipid akut pada dinding arteri tidak sama dengan kondisi aterosklerosis kronis dan tidak menggambarkan plak atheroma tahap akhir, namun, deposisi lipid menunjukkan perubahan fisiologi yang mengawali proses aterosklerosis (Yamori *et al.*, 1975, Ross, 1999). Penelitian oleh Nakano *et al.*, 2010 menjawab hipotesis “*response to retention*” yang menunjukkan bahwa peningkatan permeabilitas sel endotel dan deposisi lipid merupakan penanda awal lesi aterosklerosis sebelum terjadinya disfungsi endotel (Nakano *et al.*, 2010, Westerweel *et al.*, 2010).

Analisa deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* menunjukkan bahwa vaksin subunit LOX-1 mampu mempengaruhi pembentukan deposisi lipid. Jumlah area deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus yang divaksin dengan subunit LOX-1 lebih rendah daripada tikus yang menerima vaksin kontrol (GFP). Walaupun pencegahan deposisi lipid tidak signifikan secara statistik namun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin subunit LOX-1 memiliki pengaruh pada pembentukan deposisi lipid. Hal ini terjadi melalui aksi penghambatan LOX-1 oleh antibodi anti-LOX-1 yang terbentuk setelah vaksinasi. Antibodi anti-LOX-1 menghambat ikatan antara *ox-LDL* dengan LOX-1 sehingga *ox-LDL* tidak mengalami deposisi pada area vaskular. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Nakano *et al.*, (2010) yang membuktikan bahwa pemberian antibodi anti-LOX-1 mampu mencegah deposisi lipid pada pembuluh darah *mesenteric artery*. LOX-1 diketahui berperan dalam peningkatan retensi *ox-LDL* serum pada dinding *mesenteric artery* sehingga *ox-LDL* tearkumulasi menjadi deposit lipid. Selain itu LOX-1 juga diketahui berperan dalam meningkatkan permeabilitas *ox-LDL* dari perivaskular menembus membrane *mesenteric artery*

sehingga terdeposit pada area vaskular bagian dalam (Nakano *et al.*, 2010).

Adanya antibodi anti-LOX-1 diharapkan menghambat ikatan ox-LDL dengan LOX-1 sehingga deposit lipid tidak terbentuk. Deposisi lipid merupakan langkah awal terjadinya lesi aterosklerosis (Ross, 2005, Westerweel *et al.*, 2010).

6.4.3. Vaksinasi pNZGFP-LOX-1 dengan pembawa *L. lactis* rekombinan meningkatkan produksi antibodi IgG anti-LOX-1 serum

LOX-1 rekombinan diproduksi dalam jumlah besar melalui induksi nisin di dalam *L. lactis* menggunakan sistem *nicin-controlled expression* (NICE). Sistem ekspresi NICE merupakan sistem induksi protein rekombinan pada bakteri asam laktat (*lactic acid bacteria*) yang sangat umum digunakan dan dapat menghasilkan protein rekombinan dengan kadar tinggi (Pontes, *et al.*, 2011). Sistem ekspresi ini juga telah digunakan dalam banyak penelitian vaksin subunit rekombinan lainnya, diantaranya pengembangan vaksin colitis (Shigemori, *et al.*, 2015), virus papilloma (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011), dan listeriolisin (Bahey-El-Din *et al.*, 2008).

L. lactis yang telah mengekspresikan LOX-1 rekombinan diberikan melalui rute oral dan akan dikenali oleh sel-sel M di saluran intestinal hewan coba. Sel-sel dendritik pada area tersebut akan memfagositosis *L. lactis* dan membawanya menuju ke kelenjar limfoid. Selanjutnya akan terjadi lisis sel bakteri dan keluarnya protein subunit LOX-1 dari dalam sel. Protein subunit LOX-1 akan dipresentasikan oleh APC melalui MHC kelas II. Presentasi antigen LOX-1 akan mengaktivasi sel T helper yang selanjutnya akan mengaktivasi sel B untuk membentuk sel B memori maupun sel B plasma. Sel B plasma memproduksi antibodi anti-LOX-1. Booster vaksinasi yang dilakukan 3 kali dengan jeda waktu 2 minggu bertujuan untuk mengaktivasi *switching antibody*, yaitu dari produksi IgM menjadi IgG yang memiliki afinitas lebih tinggi. Pemberian diet tinggi lemak selama 2 minggu dapat

menginduksi ekspresi LOX-1 secara berlebihan pada SHR-SP (Nakano et al., 2010; Hamakawa et al., 2003). Ekspresi LOX-1 yang berlebihan ini akan menginduksi pembentukan antibodi IgG anti-LOX-1.

Analisa dengan metode ELISA memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan kadar IgG serum anti-LOX-1 pada tikus yang divaksinasi dengan subunit LOX-1 dibandingkan pada tikus kontrol dengan vaksinasi GFP. Hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi subunit LOX-1 dengan pembawa *L. lactis* mampu memicu respon imun sistemik berupa produksi IgG serum anti-LOX-1. Kadar antibodi anti-LOX-1 mengalami penurunan 56 hari setelah vaksinasi pertama. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa kadar IgG sebagai respon vaksin subunit dengan pembawa *L. lactis* mengalami penurunan setelah kurun waktu tertentu. Studi yang dilakukan oleh Saez, et al., 2012 menunjukkan bahwa 42 hari setelah vaksinasi, kadar IgG terhadap antigen turun ke level hingga level *baseline*. Demikian pula penelitian lain dengan menggunakan bakteri yang sama sebagai pembawa antigen anti-rotavirus menunjukkan bahwa kadar IgG serum mengalami penurunan setelah hari ke-41 paska vaksinasi (Saez, et al., 2012, Zhang, et al., 2011, Li, et al., 2010).

Antibodi IgG anti-LOX-1 yang terbentuk menghambat ikatan *ox-LDL* dengan LOX-1. Penghambatan ambilan *ox-LDL* ke dalam sel endotel oleh antibodi anti-LOX-1 akan mencegah disfungsi endotel dan deposisi lipid. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Nakano, et al., (2010) yang mendemonstrasikan bahwa pemberian antibodi anti-LOX-1 akan menurunkan deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP.

Pada studi ini, pencegahan deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tidak signifikan karena titer antibodi anti-LOX-1 yang terbentuk tidak cukup

tinggi. Rendahnya titer antibodi anti-LOX-1 dapat disebabkan karena *L. lactis* merupakan bakteri non-patogen yang tidak berkolonisasi di saluran cerna (Pereira, *et al.*, 2013). *L. lactis* dapat bertahan di saluran cerna mencit selama 24 jam dan di saluran cerna manusia hingga 3 hari (Szatraj, *et al.*, 2017). Minimnya waktu kontak antara bakteri dengan sistem imun di mukosa menyebabkan respon imun yang dipicu oleh *L. lactis* tidak cukup tinggi untuk menginduksi produksi antibodi (Szatraj, *et al.*, 2017). Penelitian lain menunjukkan bahwa *L. lactis* strain IBB477 memiliki 3 protein permukaan yang berperan dalam adhesi bakteri di saluran cerna, yaitu protein CluA, serine proteinase PrtP (Radziwill-Bienkowska, *et al.*, 2014; Radziwill-Bienkowska, *et al.*, 2016) dan YghE2 (Meyrand, *et al.*, 2013). Peningkatan waktu retensi bakteri di saluran cerna dapat memperpanjang waktu kontak dengan sel-sel imun di mukosa sehingga respon imun yang dihasilkan juga lebih tinggi.

L. lactis dipilih karena merupakan bakteri yang dianggap aman untuk dikonsumsi, sehingga mudah diaplikasikan kepada pasien. Namun, hal ini juga menjadi kendala karena *L. lactis* tidak dapat memicu sistem imun dengan baik.

Oleh karena itu perlu pertimbangan untuk menggunakan bakteri lain yang cukup aman tetapi dapat menginduksi sistem imun dengan maksimal. Beberapa bakteri lain yang telah digunakan sebagai pembawa untuk penghantaran vaksin melalui rute oral diantaranya adalah bakteri *Salmonella* spp. (Cheminay & Hensel, 2008; Hegazy & Hensel, 2012; Wang, *et al.*, 2013) dan *Listeria monocytogenes* yang telah dilemahkan atau strain rekombinannya (*L. monocytogenes* $\Delta 2$) (Dowd, *et al.*, 2016; Shahabi, *et al.*, 2010; Sinha, *et al.*, 2017).

Dalam studi ini juga tidak dilakukan optimasi jumlah bakteri yang diberikan.

Optimasi jumlah bakteri perlu dilakukan untuk menentukan titer antigen.

Percobaan dengan menggunakan 1×10^{10} CFU bakteri didasarkan pada beberapa penelitian sebelumnya (Di Marco, *et al.*, 2013; Han, *et al.*, 2006). Walaupun demikian, dosis ini dianggap belum cukup untuk dapat menginduksi sistem imun dengan efektif. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi dosis untuk menentukan jumlah *L. lactis* yang efektif dalam memicu sistem imun. Selain itu, interval dan frekuensi pemberian juga perlu dioptimasi untuk mendapatkan hasil yang diharapkan.

Lebih lanjut, walaupun studi prediksi *epitope* telah dilakukan sebelumnya dan menunjukkan bahwa LOX-1 memiliki *epitope* yang dapat dikenali oleh sel B dan sel T, namun LOX-1 merupakan protein endogen yang tidak dikenali oleh sistem imun sebagai molekul *non-self*. Dalam penelitian ini, subunit LOX-1 yang diberikan merupakan protein rekombinan yang diproduksi oleh *L. lactis* sehingga kemungkinan memiliki struktur yang sedikit berbeda dengan protein LOX-1 endogen tikus. *L. lactis* merupakan prokariota yang tidak dapat melakukan modifikasi pasca translasi dan membentuk ikatan disulfida sehingga konformasi tiga dimensi protein LOX-1 yang dihasilkan oleh *L. lactis* berbeda dengan LOX-1 endogen tikus. Walaupun demikian, perbedaan struktur ini belum dapat menginduksi sistem imun dengan baik. Dalam penelitian ini, subunit LOX-1 juga dikonjugasikan dengan GFP yang merupakan protein asing bagi tikus. Diharapkan konjugasi ini juga akan meningkatkan antigenitas dari subunit LOX-1. Akan tetapi, dari hasil analisa yang diperoleh, titer antibodi anti-LOX-1 dianggap belum cukup tinggi untuk dapat menghambat ikatan ox-LDL dengan LOX-1.

6.4.4. Pengaruh vaksinasi subunit LOX-1 pada profil lipid SHR-SP

Pemberian diet tinggi lemak pada SHR-SP selama 2 minggu mampu meningkatkan kadar kolesterol total, trigliserida, dan kolesterol LDL (Hamakawa,

et al., 2003). Studi yang dilakukan oleh Kato *et al.*, 2000 menunjukkan bahwa 3 QTL pada kromosom 5, 7, dan 15 memiliki peran dalam abnormalitas metabolisme kolesterol pada SHR-SP. Abnormalitas metabolisme kolesterol diprediksi terjadi dalam proses transfer balik kolesterol dari jaringan ke plasma (Kato, *et al.*, 2000). Analisa profil lipid menunjukkan bahwa vaksin subunit LOX-1 tidak mempengaruhi kadar kolesterol total, kolesterol HDL, trigliserida, dan kolesterol LDL serum secara signifikan. Hal ini disebabkan karena mekanisme kerja vaksin subunit LOX-1 mungkin tidak mempengaruhi metabolisme lipid secara langsung.

Vaksin subunit LOX-1 bekerja melalui penghambatan ambilan *ox-LDL* ke dalam sel endotel dan tidak mempengaruhi biosintesis maupun metabolisme lipid.

6.5. Kesimpulan

1. LOX-1 rekombinan dapat diproduksi oleh *L. lactis* dengan induksi nisin.
2. Kadar antibodi IgG anti-LOX-1 meningkat pada SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1 dengan pembawa *L. lactis* ($p = 0,046$ pada hari ke-35 setelah vaksinasi pertama dan $p = 0,039$ pada hari ke-56 setelah vaksinasi pertama).
3. Deposisi lipid pada jaringan *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan diet tinggi lemak yang divaksinasi dengan vaksin subunit LOX-1 dengan pembawa *L. lactis* tampak menurun ($p = 0,232$).
4. Kadar lipid serum SHR-SP tidak dipengaruhi oleh vaksinasi subunit LOX-1 (kolesterol total: $p = 0,756$; HDL-C: $p = 0,145$; LDL-C: $p = 0,700$; TG: $p = 0,790$; PL: $p = 0,501$).

6.6. Saran

1. Perlu dilakukan optimasi dengan strain *L. lactis* yang dapat berkolonisasi sehingga dapat memicu respon imun yang lebih tinggi.

2. Perlu dilakukan optimasi dosis dan frekuensi vaksinasi sehingga dapat memicu respon imun yang optimal.





BAB VII

PEMBAHASAN UMUM

Vaksinasi merupakan upaya pencegahan aterosklerosis yang layak dikembangkan. Hingga saat ini terapi pencegahan aterosklerosis terbatas pada pengaturan pola makan dan perubahan gaya hidup yang seringkali belum diterapkan secara efektif atau tidak diterapkan sejak dini. Pada dekade terakhir, upaya pencegahan aterosklerosis dengan menggunakan metode vaksinasi mulai dikembangkan (Shah, *et al.*, 2014), diantaranya dengan menggunakan apoB (Herbin, *et al.*, 2012), CETP (Liaw, *et al.*, 2014), TIE (Hauer, *et al.*, 2009), dan VEGFR2 (Hauer, *et al.*, 2007).

LOX-1 merupakan protein yang memiliki peran sentral dalam disfungsi endotel dan aterosklerosis (Sawamura, *et al.*, 1997). Beberapa strategi penghambatan LOX-1, misalnya dengan menggunakan micro-RNA (Chen, *et al.*, 2017; Liu, *et al.*, 2017) dan antibodi (De Siqueira, *et al.*, 2015) menunjukkan hasil yang cukup menjanjikan sebagai kandidat terapi aterosklerosis. Produksi antibodi anti-LOX-1 dan metode penggunaannya juga telah dipatenkan (Heldwein, *et al.*, 2011). Hal ini menjelaskan bahwa LOX-1 merupakan target terapi aterosklerosis yang sangat potensial.

Dalam penelitian ini digunakan pendekatan yang baru, yaitu LOX-1 sebagai kandidat vaksin. Studi pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya mendemonstrasikan potensi protein LOX-1 dalam mencegah inflamasi pada tikus dengan diet tinggi lemak (Adianingsih, *et al.*, 2016). Selain itu studi secara *in silico* juga menunjukkan bahwa LOX-1 memiliki *epitope* yang dapat memicu sistem imun humoral dan selular (Yurina, *et al.*, 2017). Penelitian ini menunjukkan potensi LOX-

1 sebagai kandidat terapi melalui dua pendekatan baru yang berbeda, yaitu pendekatan vaksin DNA dengan adjuvan alum dan vaksin subunit dengan pembawa bakteri (*L. lactis*).

Pada awal penelitian ini akan digunakan bakteri *Salmonella typhimurium* AroA- yang digunakan sebagai pembawa. Namun karena regulasi dari pemerintah yang tidak memungkinkan dilakukan impor bakteri patogen, maka dilakukan modifikasi dengan menggunakan alum sebagai adjuvan vaksin DNA.

Metode vaksin DNA LOX-1 menunjukkan hasil yang diharapkan, yaitu tampak dapat menghambat pembentukan sel busa dan kerusakan struktur intima media pada jaringan intima media aorta, menghambat penurunan ekspresi LOX-1 pada sel endotel, dan menghambat penurunan ekspresi eNOS pada jaringan aorta tikus Wistar dengan diet tinggi lemak. Hasil ini membuktikan bahwa LOX-1 yang diberikan secara intramuskuler dengan adjuvan alum cenderung dapat mencegah disfungsi endotel yang ditunjukkan melalui penghambatan penurunan kadar eNOS dalam jaringan aorta tikus yang divaksinasi. Disfungsi endotel juga ditandai dengan aktivasi NF- κ B yang diikuti dengan pelepasan sitokin pro-inflamasi.

Penelitian pendukung memperlihatkan bahwa aktivasi Nf- κ B, ekspresi TNF- α , dan IL-6 menurun pada sel endotel aorta tikus yang divaksinasi dengan pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 dibandingkan pada sel endotel aorta tikus yang tidak divaksinasi, divaksinasi dengan alum atau plasmid kosong (Aisyafuri, 2017, Parhusip, 2017, dan Al-Muyasaroh, 2017).

Analisa ekspresi LOX-1 pada jaringan aorta memperlihatkan hasil dengan pola yang sama, yaitu terjadinya kecenderungan penghambatan ekspresi protein LOX-1 pada sel endotel aorta tikus yang divaksinasi dengan pLOX-1 dan pGFP-

LOX-1. Ekspresi LOX-1 hanya terjadi dalam kondisi tertentu, misalnya hiperkolesterolemia, diabetes mellitus, dan hipertensi (Hermonat, *et al.*, 2011).

Pengamatan jaringan aorta juga menunjukkan bahwa tikus yang divaksinasi dengan vaksin DNA LOX-1 memiliki struktur jaringan intima media aorta yang relatif normal dibandingkan tikus yang tidak divaksinasi. Kerusakan struktur intima media aorta pada tikus diindikasikan dengan banyaknya infiltrasi mononuklear dan perubahan atau hilangnya sel otot polos. Pada tikus yang divaksinasi jumlah sel busa juga tampak lebih sedikit dibandingkan pada tikus yang tidak menerima vaksinasi. Kecenderungan penurunan kadar LOX-1, tingginya ekspresi eNOS dan minimnya kerusakan jaringan aorta menunjukkan efektivitas vaksin DNA LOX-1 dengan aduan alum sebagai kandidat terapi aterosklerosis.

Tidak ada perbedaan bermakna antara ekspresi eNOS, LOX-1, dan jumlah sel busa pada jaringan aorta tikus yang divaksinasi dengan pLOX-1 dan pGFP-LOX-1 menjelaskan bahwa protein GFP yang difusikan dengan LOX-1 tidak menurunkan efektivitas vaksinasi. GFP merupakan protein yang sangat umum digunakan sebagai marker penanda ekspresi protein rekombinan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Snapp, 2010; Soboleski *et al.*, 2005).

Dalam vaksinasi DNA ini tidak dilakukan penentuan jumlah sel T CD8 sitolitik yang teraktivasi karena keterbatasan fasilitas dan waktu. Hal ini menjadi kelemahan utama penelitian ini karena tidak dapat menjelaskan mekanisme kerja vaksin DNA LOX-1. Vaksin DNA LOX-1 yang diekspresikan sebagai protein intraseluler diprediksi akan dikenali dan dipresentasikan oleh MHC kelas I sehingga memicu respon imun selular berupa sel T CD8 sitolitik. Sel ini akan mengenali protein LOX-1 yang tereksresi berlebihan pada permukaan sel endotel

dan memicu terjadinya lisis sel endotel. Selain itu, diharapkan vaksin DNA juga memicu reaksi silang yang menginduksi aktivasi sel B dan produksi antibodi anti-LOX-1. Penelitian pendukung yang dilakukan Murti, 2017 menunjukkan antibodi IgG anti-LOX-1 serum tidak terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa pencegahan disfungsi endotel tidak terjadi melalui respon imun humoral.

Keterbatasan lain dalam penelitian ini adalah jumlah sampel yang minim, yaitu hanya 2 hingga 4 ekor/ kelompok. Hal ini disebabkan karena terjadinya kematian pada hewan coba sebelum perlakuan berakhir. Kematian hewan coba tersebut diakibatkan karena kondisi kandang yang kurang memenuhi syarat, ditinjau dari standar kebersihan yang rendah dan minimnya sirkulasi udara sehingga menyebabkan tumbuhnya parasit pada kulit hewan coba. Waktu penelitian yang lama juga menimbulkan stress pada hewan coba dan mengakibatkan kematian. Walaupun demikian, analisa pada berbagai parameter menunjukkan pola yang sama, yaitu pada tikus yang divaksin dengan vaksin DNA LOX-1 tampak penghambatan disfungsi endotel, penurunan ekspresi LOX-1, sitokin pro-inflamasi, dan pembentukan sel busa yang lebih rendah dibandingkan tikus yang tidak divaksinasi. Analisa hitopatologi juga menunjukkan pola yang sama, yaitu tampaknya pencegahan kerusakan struktur pada area sub-intima dan intima media aorta.

Selain itu, dalam penelitian vaksin DNA ini digunakan tikus strain Wistar dengan diet tinggi lemak sebagai hewan coba. Walaupun uji pendahuluan menunjukkan bahwa pemberian diet tinggi lemak dengan pemanasan dapat menimbulkan kerusakan struktur jaringan aorta dan menginduksi peningkatan kadar LDL kolesterol secara bermakna, tetapi plak aterosklerosis tahap akhir tetap tidak terbentuk. Hal tersebut membuktikan bahwa tikus strain Wistar sebenarnya

bukan hewan coba ideal untuk studi ini. Sebaiknya digunakan hewan coba transgenik yang dapat menstimulasikan kondisi aterosklerosis dengan baik, misalnya mencit LDLR-, ApoE-, atau tikus SHR-SP (Tannock & King, 2010).

Dalam penelitian kedua digunakan pendekatan menggunakan vaksin subunit LOX-1 yang diberikan melalui rute oral dengan pembawa *L. lactis*. Bakteri ini dipilih karena aman dikonsumsi (Bermúdez-Humarán, 2009) dan dapat mengekspresikan protein rekombinan dengan kadar tinggi (Mierau & Kleerebezem, 2005). *L. lactis* juga telah umum digunakan sebagai pembawa vaksin subunit rekombinan dan diketahui dapat memicu sistem imun dengan baik (Xin, *et al.*, 2003; Chamcha, *et al.*, 2015; Shigemori & Shimosato, 2017).

Vaksin subunit dipilih dalam penelitian tahap kedua dan bukan menggunakan vaksin DNA karena mekanisme penghantaran DNA oleh *L. lactis* belum diketahui secara jelas. Beberapa penelitian mendemonstrasikan bahwa *L. lactis* mampu menghantarkan DNA ke dalam sel secara *in vitro* (Yagnik *et al.*, 2016; Yagnik, *et al.*, 2017). Namun, pemahaman mekanisme penghantaran DNA oleh *L. lactis* masih terbatas. Sebaliknya, penggunaan *L. lactis* sebagai pembawa vaksin subunit telah banyak dibuktikan (Xin, *et al.*, 2003; Chamcha, *et al.*, 2015; Shigemori & Shimosato, 2017), sehingga pendekatan ini dipilih dalam penelitian tahap II.

Hasil penelitian tahap II menunjukkan bahwa vaksin subunit LOX-1 mampu meningkatkan respon imun humoral melalui produksi antibodi IgG anti-LOX-1 secara signifikan. Walaupun demikian, jumlah antibodi yang dihasilkan dianggap kurang tinggi untuk dapat menghambat LOX-1 yang terekspresi pada permukaan sel endotel. Hambatan ambilan ox-LDL ke dalam sel endotel yang kurang optimal menyebabkan tetap terbentuk deposisi lipid pada area *abdominal mesenteric*

artery. Sebagai akibatnya, jumlah area deposisi lipid tidak berkurang secara signifikan. Deposisi lipid pada dinding vascular merupakan penanda awal lesi aterosklerosis. LOX-1 diketahui berperan dalam deposisi lipid pada dinding vaskular melalui retensi lipid dan peningkatan permeabilitas vaskular (Nakano *et al.*, 2010; Ross, 1999; Westerweel *et al.*, 2010).

L. lactis tidak berkolonisasi di dalam saluran cerna manusia dan mencit, sehingga tidak dapat memicu respon imun yang cukup tinggi (Pontes, *et al.*, 2011). Penelitian lain menunjukkan bahwa penggunaan *L. lactis* yang mengekspresikan protein *adhesin* (Radziwill-Bienkowska, *et al.*, 2014) dapat bertahan lebih lama pada saluran cerna sehingga respon imun yang dihasilkan juga lebih tinggi. Strain ini dianggap lebih sesuai untuk digunakan sebagai pembawa vaksin LOX-1. Keterbatasan lain dalam penelitian tahap II adalah tidak dilakukan penentuan ekspresi LOX-1 di jaringan *abdominal mesenteric artery* sehingga belum dapat menggambarkan mekanisme kerja vaksinasi dengan lengkap.

Hasil studi membuktikan bahwa kedua pendekatan vaksinasi LOX-1 menunjukkan hasil yang cukup potensial sebagai kandidat vaksin anti-aterosklerosis. Pendekatan dengan menggunakan vaksin DNA menunjukkan bahwa vaksin DNA LOX-1 tampak mencegah kerusakan struktur intima media, pembentukan sel busa ($p = 0,096$), dan disfungsi endotel melalui penghambatan penurunan ekspresi eNOS ($p = 0,419$). Vaksin subunit LOX-1 tampak menghambat deposisi lipid vaskular walaupun secara statistik tidak signifikan ($p = 0,232$).

Kedua pendekatan vaksinasi bekerja melalui mekanisme kerja yang berbeda, di mana vaksin DNA diprediksi bekerja melalui sistem imun selular sementara vaksin subunit diketahui dapat menginduksi sistem imun humoral

melalui peningkatan produksi antibodi anti-LOX-1. Walaupun demikian, perlu dilakukan optimasi untuk menghasilkan respon imun yang lebih tinggi untuk kedua pendekatan tersebut. Optimasi yang perlu dilakukan misalnya meliputi optimasi dosis, pemilihan adjuvan, rute, dan frekuensi pemberian. Lebih lanjut, pada tahap penelitian berikutnya juga perlu dilakukan studi mengenai keamanan penggunaan vaksin LOX-1 melalui uji toksisitas.



BAB IX

KESIMPULAN DAN SARAN

9.1. Kesimpulan

1. Vaksin DNA LOX-1 tampak mencegah disfungsi endotel melalui penghambatan penurunan ekspresi eNOS ($p=0,419$) dan pembentukan sel busa ($p=0,096$) pada jaringan aorta tikus (*R. norvegicus*) strain Wistar.
2. Pemberian vaksin subunit LOX-1 dengan pembawa *L. lactis* NZ9000 tampak menghambat deposisi lipid ($p = 0,232$) pada *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan diet tinggi lemak.

9.2. Saran

1. Perlu dilakukan uji ekspresi pLOX-1 pada sel mamalia yang menjadi target vaksinasi, misalnya sel dendritik atau sel miosit.
2. Perlu dilakukan optimasi dosis, rute pemberian, frekuensi pemberian, dan variasi adjuvan untuk memicu respon imun yang lebih tinggi pada pemberian vaksin DNA LOX-1.
3. Perlu dilakukan pengujian efektivitas vaksin DNALOX-1 pada hewan coba yang dapat menstimulasikan kondisi aterosklerosis dengan baik.
4. Perlu digunakan strain *L. lactis* yang lain atau bakteri lain yang dapat memicu respon imun yang lebih tinggi pada pemberian vaksin subunit LOX-1.
5. Perlu ditentukan ekspresi LOX-1 pada jaringan *abdominal mesenteric artery* SHR-SP dengan vaksin subunit LOX-1 untuk menentukan mekanisme kerja vaksin.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2015. Cellular and Molecular Immunology 8th edition, Philadelphia: Elsevier Saunders. h: 231-237, 251, 261-262, 266

Adianingsih, O.R., Tamara, F., Putri, A.P., Nurkhairina, A., Albaar, T.M., Arthamin, M., Yurina, V., 2016. Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) Protein Vaccination Reduces Inflammation and Attenuates Atherosclerosis Progression in Atherogenic-Diet Wistar Rats, *Int Cardiovas Res J.* **10** (4) :159–164.

Adil, M.M., Erdman, Z.S., Kokkoli, E., 2014. Transfection mechanisms of polyplexes, lipoplexes, and stealth liposomes in $\alpha 5\beta 1$ integrin bearing DLD-1 colorectal cancer cells. *Langmuir*, **30** (13): 3802–3810.

Aisyafuri, E., 2017. Pengaruh Pemberian Vaksin DNA Epitop Lox-1 Terhadap Ekspresi TNF- α di Aorta Jantung Tikus Rattus Novergicus Model Aterosklerosis. Tugas Akhir. Program Studi Farmasi. Fakultas KEdokteran. Universitas Brawijaya.

Al-Muyasaroh, A. M. 2017. Pengaruh Vaksin DNA Berbasis Epitop LOX-1 Terhadap Ekspresi IL-6 pada Sel Endotel Aorta Jantung Tikus Rattus Norvegicus Model Aterosklerosis. Tugas Akhir. Program Studi Farmasi. Fakultas KEdokteran. Universitas Brawijaya.

Atyanta, A.T. 2017. Pengaruh Pemberian Vaksin DNA Epitop LOX-1 terhadap Ketebalan Dinding Aorta Rattus novergicus Galur Wistar dengan Diet Aterogenik. Tugas Akhir. Program Studi Farmasi. Fakultas KEdokteran. Universitas Brawijaya.

Babiuk, L. a., Pontarollo, R., Babiuk, S., Loehr, B., Van Drunen Littel-van den Hurk, S., 2003. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine*, **21**(7–8): 649–658.

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. 2013. RISET KESEHATAN DASAR.

Bahey-EI-Din, M., 2012. Lactococcus lactis-based vaccines from laboratory bench to human use: An overview. *Vaccine*, **30**(4): 685–690

Bermúdez-Humarán, L.G., 2009. Lactococcus lactis as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Hum. Vaccin.*, **5**(4):264–267.

Bermúdez-Humarán, L.G., Kharrat, P., Chatel, J.-M., Langella, P., 2011. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb. Cell Fact*, **10**(Suppl 1): S4.

- Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., Rezzani, R., 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*, **23**: 381–390.
- Bustin, S. A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, **29**(1): 23–39.
- Camaré, C., Trayssac, M., Garmy-Susini, B., Mucher, E., Sabbadini, R., et al, 2015. Oxidized LDL-induced angiogenesis involves sphingosine 1-phosphate: prevention by anti-S1P antibody. *Br. J. Pharmacol.*, **172**(1):106–118.
- Chamcha, V., Jones, A., Quigley, B.R., Scott, J.R., Amara, R.R., 2015. Oral Immunization with a Recombinant Lactococcus lactis-Expressing HIV-1 Antigen on Group A Streptococcus Pilus Induces Strong Mucosal Immunity in the Gut. *J. Immunol.*, **195**(10): 5025–34.
- Cheminay, C., Hensel, M., 2008. Rational design of Salmonella recombinant vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.*, **298**(1–2):87–98.
- Chen, H., McCarty, D.M., Bruce, A.T., Suzuki, K., Suzuki, K., 1998. Gene transfer and expression in oligodendrocytes under the control of myelin basic protein transcriptional control region mediated by adeno-associated virus. *Gene Ther.* **5**: 50–58
- Chen, K., Chen, J., Liu, Y., Xie, J., Li, D., Sawamura, T., Hermonat, P., Mehta, J. L., 2005. Adhesion molecule expression in fibroblasts: alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids. *Hypertension*, **46**(3): 622–627
- Chen, M., Inoue, K., Narumiya, S., Masaki, T., Sawamura, T., 2001. Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. *FEBS Lett*, **499**(3): 215–219.
- Chen, Z., Wang, M., He, Q., Li, Z., Zhao, Y., Wang, W., Ma, J., Li, Y., Chang, G., 2017. MicroRNA-98 rescues proliferation and alleviates ox-LDL-induced apoptosis in HUVECs by targeting LOX-1. *Exp. Ther. Med.*, **13**(5): 1702–1710.
- Chistiakov, D.A., Orekhov A.N., Bobryshev, Y., 2016. LOX-1-Mediated Effects on Vascular Cells in Atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem.*, 2016; **38**:1851–1859
- Clarke, M., Bennett, M., 2006. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am. J. Nephrol.*, **26**(6): 531–535.
- Clarke, M.C.H., Littlewood, T.D., Figg, N., Maguire, J.J., Davenport, A.P., et al, 2008. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates



atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ. Res.*, **102**(12): 1529–1538.

Coban, C., Kobiyama, K., Aoshi, T., Takeshita, F., Horii, T., Akira, S., & J. Ishii, K., 2011. Novel Strategies to Improve DNA Vaccine Immunogenicity. *Curr. Gene Ther.*, **11**(6): 479–484.

Coban, C., Koyama, S., Takeshita, F., Akira, S., Ishii, K.J., 2008. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Hum. Vaccin.* **4**(6): 453–457.

Cui, S., Zhang, S., Chen, H., Wang, B., Zhao, Y., Zhi, D., 2012. The Mechanism of Lipofectamine 2000 Mediated Transmembrane Gene Delivery. *Engineering*, **4**: 172–175.

Deanfield, J.E., Halcox, J.P., Rabelink, T.J., 2007. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*, **115**(10): p.1285–1295.

Desmet, C.J., Ishii, K.J., 2012. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat. Rev. Immunol.*, **12**(7): 479–491

Donnelly, J.J., Wahren, B., Liu, M. a, 2005. DNA vaccines: progress and challenges. *J. Immunol.*, **175**(2): 633–639.

Dowd, G.C., Bahey-el-din, M., Casey, P.G., Joyce, S.A., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2016. *Listeria monocytogenes* mutants defective in gallbladder replication represent safety-enhanced vaccine delivery platforms. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**(8): 2059–2063.

Eder, K., Keller, U., Hirche, F., Brandsch, C., 2003. Thermally Oxidized Dietary Fats Increase the Susceptibility of Rat LDL to Lipid Peroxidation but Not Their Uptake by Macrophages. *J. Nutr.*, **133**: 2830–2837.

Skelton, D., Satake, N., Kohn, D.B., 2001. The enhanced green fluorescent protein (eGFP) is minimally immunogenic in C57BL/6 mice. *Gene Ther.*, **8**: 1813–1814.

Faxon, D.P., Fuster, V., Libby, P., Beckman, J. a., Hiatt, W.R., et al, 2004. Atherosclerotic vascular disease conference. Writing group III: Pathophysiology. *Circulation*, **109**: 2617–2625.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., et al, 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**(21): 7413–7417.

Fowkes, F. G. R., Rudan, D., Rudan, I., Aboyans, V., Denenberg, J. O., McDermott, M. M., Norman, P.E., Sampson, U.K.A., Williams, L.J., Mensah, G.A., Criqui, M. H., 2013. Comparison of global estimates of prevalence and



risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: A systematic review and analysis. *Lancet*, **382**(13):1329–1340.

Francone, O. L., Tu, M., Royer, L. J., Zhu, J., Stevens, K., Oleynek, J. J., Kane, C. D., 2009. The hydrophobic tunnel present in LOX-1 is essential for oxidized LDL recognition and binding. *J. Lipid Res.*, **50**(3): 546–555.

Frostegård, J., 2013. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med.*, **11**: 117.

Gareus, R., Kotsaki, E., Xanthoulea, S., van der Made, I., Gijbels, M. J. J., Kardakaris, R., Polykratis, A., Kollias G., Winther, M.P., Pasparakis, M., 2008. Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab.* **8**(5): 372–83.

Garrido-Polonio, C., García-Linares, M.C., García-Arias, M.T., López-Varela, S., García-Fernández, M.C., Terpstra, A.H.M., Sanchez-Muniz F.J., 2004. Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *Br. J. Nutr.*, **92**: 257–265.

Getz, G.S., 2005. Diet and Murine Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**(2): 242–249.

Ghimire, T.R., 2015. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. *Springer plus*, **4**(181): 1-18

González-Navajas, J.M., Lee, J., David, M., Raz, E., 2012. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.*, **12**(2):125–135.

Gurunathan, S., Wu, C.Y., Freidag, B.L., Seder, R. a., 2000. DNA vaccines: A key for inducing long-term cellular immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 442–447.

Hamakawa, Y., Omori, N., Sato, K., Nagano, I., Shoji, M., et al, 2003. Expression of LOX-1 in spontaneously hypertensive rat carotid atherosclerotic lesions. *Int. Congr. Ser.*, **1252**(C): 209–212.

Han, W., Mercenier, A., Ait-belgnaoui, A., Pavan, S., Lamine, F., et al, 2006. Improvement of an Experimental Colitis in Rats by Lactic Acid Bacteria Producing Superoxide Dismutase, *Inflamm Bowel Disease.* **12**(11): 1044–1052.

Handayani, D., Chen, J., Meyer, B.J., Huang, X.F., 2011. Dietary Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) Prevents Fat Deposition and Lowers Triglyceride in Rats Fed a High-Fat Diet. *J. Obes.*, 2011: 258051.

Handayani, D., Meyer, B.J., Chen, J., Tang, P., Chi, P., et al, 2012. The Comparison of the Effect of Oat and Shiitake Mushroom Powder to Prevent

- Body Weight Gain in Rats Fed High Fat Diet. , *Food and Nutrition Sci.* **2012**(3): 1009–1019.
- Harvey, A.P., Montezano, A.C., Hood, K.Y., Lopes, R.A., Rios, F., et al, 2017. Vascular dysfunction and fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: The aldosterone-mineralocorticoid receptor-Nox1 axis. *Life Sci.*, 179, p.110–119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.05.002>.
- Hauer, A.D., Habets, K.L.L., van Wanrooij, E.J. a, de Vos, P., Krueger, J., et al, 2009. Vaccination against TIE2 reduces atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 204(2), p.365–371.
- Hauer, A.D., van Puijvelde, G.H.M., Peterse, N., de Vos, P., van Weel, V., Ceravalo, G., Graham, D., Thouyz, R.M., 2007. Vaccination against VEGFR2 attenuates initiation and progression of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**(9):2050–7.
- Hegazy, W.A.H., Hensel, M., 2012. Salmonella enterica as a vaccine carrier. *Future Microbiol.* 7(1): 111–127.
- Heldwein, K.A., Brogdon, J., Dole, W., Trauger, J., Tang, Y., Neugebauer, J., Schmid, A., 2017. Lectin-Like Oxidized LDL Receptor-1, Antibodies and Methods of Use. US 9,562,101 B2.
- Herbin, O., Ait-Oufella, H., Yu, W., Fredrikson, G.N., Aubier, B., Perez, N., Barateau, V., Nilsson, J., Tedgui, A., Mallat, Z., 2012. Regulatory T-cell response to apolipoprotein B100-derived peptides reduces the development and progression of atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**(3): 605–612.
- Hermonat, P.L., Zhu, H., Cao, M., Mehta, J.L., 2011. LOX-1 transcription. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 25(5): 393–400.
- Hirsch, H. A, Iliopoulos, D., Joshi, A., Zhang, Y., Savina, Savina, J.A., Bulyk M.,Tschlis P.N., Liu S.X., Struhl K., 2011. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell*, **17**(4): 348–361.
- Hogenesch, H., 2002. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. , *Immunother Vacc.* **20** (3):34–39.
- Hong, D., Bai, Y., Gao, H., Wang, X., Li, L., Zhang, G., Hu, C., 2014. Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis via the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway. *Atherosclerosis*, **235**(2):310–317.
- Endothelial fibroblast growth factor receptor signaling is required for vascular remodeling following cardiac ischemia-reperfusion injury

House, S. L., Castro, A. M., Lupu, T. S., Weinheimer, C., Smith, C., Kovacs, A., & Ornitz, D. M. 2016. Endothelial fibroblast growth factor receptor signaling is required for vascular remodeling following cardiac ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **310** (5) :559–571.

Hu, C., Dandapat, A., Sun, L., Chen, J., Marwali, M. R., Romeo, F., Sawamura, T., Mehta, J. L. 2008. LOX-1 deletion decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor knockout mice fed a high-cholesterol diet. *Cardiovas. Res.*, **79**(2):287–93.

Ishii, K.J., Akira, S., 2006. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol.* **27**(11):525–532.

Ishino, S., Mukai, T., Kume, N., Asano, D., Ogawa, M., Kuge, Y., Minami, M., Kita, T., Shiomi, M., Saji, H. 2007. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression is associated with atherosclerotic plaque instability — analysis in hypercholesterolemic rabbits, *Atherosclerosis.* **195**:48–56.

Jan, M., Meng, S., Chen, N. C., Mai, J., Wang, H., & Yang, X.-F., 2010. Inflammatory and autoimmune reactions in atherosclerosis and vaccine design informatics. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**: 459798.

Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimura, N., Kita, T. 2000. Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding. *J. Biol. Chem.*, **275**(9):6573–6579.

Kato, N., Tamada, T., Nabika, T., Ueno, K., Gotoda, T., et al, 2000. Identification of quantitative trait loci for serum cholesterol levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Arter. Thromb Vasc Biol*, **20**(1):223–229

Kelly, K.J., Wu, P., Patterson, C.E., Temm, C., Dominguez, J.H., 2008. LOX-1 and inflammation: a new mechanism for renal injury in obesity and diabetes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **294**(5):1136-1145.

Kool, M., Fierens, K., Lambrecht, B.N., 2012. Alum adjuvant: Some of the tricks of the oldest adjuvant. *J. Med. Microbiol.*, **61**(7):927–934.

Kulkarni, J.A., Myhre, J.L., Chen, S., Tam, Y.Y.C., Danescu, A., et al, 2017. Design of lipid nanoparticles for in vitro and in vivo delivery of plasmid DNA. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, **13**(4):1377–1387.

Kutzler, M.A., Weiner, D.B., 2008. DNA vaccines : ready for prime time ? *Genetics.* **9**(September):776–788.

Li, D., Liu, L., Chen, H., Sawamura, T., Ranganathan, S., & Mehta, J. L. 2003. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of



matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, **107**:612–617.

Li, D., Mehta, J.L., 2009. Intracellular Signaling of LOX-1 in Endothelial, *Circulation Res.*, 566–568.

Li, L., Saade, F., Petrovsky, N., 2012. The future of human DNA vaccines. *J. Biotechnol.*, **162**(2):171–182.

Li Y-J., Ma G-P., Li G-W., Qiao X-Y., Ge J-W., Tang L-J., Liu M., Liu L-W., 2010. Oral Vaccination with the Porcine Rotavirus VP4 Outer Capsid Protein Expressed by *Lactococcus lactis* Induces Specific Antibody Production. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 708460

Liaw, Y.-W., Lin, C.-Y., Lai, Y.-S., Yang, T.-C., Wang, C.-J., Whang-Peng, J., Liu, L.F., Lin, C-P., Nieh, S., Lu, S-C., Hwang J., 2014. A Vaccine Targeted at CETP Alleviates High Fat and High Cholesterol Diet-Induced Atherosclerosis and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Rabbit. *PLoS One*, **9**(12):111529.

Libby, P., 2003. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am. J. Cardiol.*, **91**(2):3A–6A.

Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K., 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, **473**:317–325.

Libby, P., Theroux, P., 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, **111**: 3481–3488.

Liu, J., Thewke, D.P., Su, Y.R., Linton, M.F., Fazio, S., Sinensky, M.S., 2005. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**(1):174–179.

Liu, M.A., 2003. DNA vaccines : a review. , *J. Intern. Med*: 402–410.

Liu, M., Tao, G., Liu, Q., Liu, K., Yang, X., 2017. MicroRNA let-7g alleviates atherosclerosis via the targeting of LOX-1 in vitro and in vivo. *Int. J. Mol. Med.*, **40**(1): 57–64.

Lizee, G., Aerts, J.L., Gonzales, M., Chinnasamy, N., Morgan, R.A., Topalian, S.L., Real-Time Quantitative Reverse Reaction as a Method for Determining Lentiviral Vector Titers and Measuring Transgene Expression. *Human Gene Therapy*, 14:497-507.

Mango, R., Predazzi, I.M., Romeo, F., Novelli, G., 2011. LOX-1/LOXIN: the yin/yang of atherosclerosis. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **25**(5):489–94.

Di Marco, E., Gray, S.P., Jandeleit-Dahm, K., 2013. Diabetes alters activation and repression of pro- and anti-inflammatory signaling pathways in the vasculature. *Front. Endocrinol.* 4(June):68.

Medina, E., Guzmán, C.A., 2001. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: Potential and limitations. *Vaccine*, 19(13–14):1573–1580.

Mehta, J.L., Chen, J., Hermonat, P.L., Romeo, F., Novelli, G., 2006a. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc. Res.*, 69(1):36–45.

Mehta, J. L., Sanada, N., Hu, C. P., Chen, J., Dandapat, A., Sugawara, F., Satoh, H., Inoue, K., Kawase, Y., Jishage, K., Suzuki, H., Takeya, M., Schnackenberg, L., Beger, R., Hermonat, P.L., Thomas, M. and Sawamura, T. 2007. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circulation Res.*, 100(11), 1634–42.

Meyrand, M., Guillot, A., Goin, M., Furlan, S., Armalyte, J., Kulakauskas, S., Cortes-Perez N.G., Thomas G., Chat S., Pe'choux C., Dupres, V., Hols P., Dufre'ne Y.F., Trugnan, G., Chapot-Chartier, M.P., 2013. Surface Proteome Analysis of a Natural Isolate of *Lactococcus lactis* Reveals the Presence of Pili Able to Bind Human Intestinal Epithelial Cells. *Mol. Cell. Proteomics*, 12(12):3935–3947.

Mierau, I., Kleerebezem, M., 2005. 10 Years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68(6):705–717.

Mollace, V., Gliozzi, M., Musolino, V., Carresi, C., Muscoli, S., Mollace, R., Tavernese, A., Gratteri, S., Palma, E., Morabito, C., Vitale, C., Muscoli, C., Fini, M., Romeo, F., 2015. Oxidized LDL attenuates protective autophagy and induces apoptotic cell death of endothelial cells: Role of oxidative stress and LOX-1 receptor expression. *Int. J. Cardiol.*, 184, p.152–158.

Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, a. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., Ferranti, S., Després, J.P., Fullerton, H.J., Howard, V.J., Huffman, M.D., Judd, S.E., Kissela, B.M., Lackland, D.T., Lichtman, J. H., Lisabeth, L.D., Liu, S., Mackey, R.H., Matchar, D.B., McGuire, D. K., Mohler III E.R., Moy, C.S., Muntner, P., Mussolino, M.E., Nasir, K., Neumar, R.W., Nichol, G., Palaniappan, L., Pandey, D.K., Reeves, M.J., Rodriguez, C.J., Sorlie, P.D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T.N., Virani, S.S., Willey, J.ZZ., Woo, D., Yeh, R.W., Turner, M. B. 2015. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics-2015 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 131, 434–441.

Murti, D.S. 2017. Pengaruh Vaksin Dna Epitop Lox-1 Terhadap Kadar Igg Antilox-1 Pada Rattus Norvegicus Model Aterosklerosis. Program Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran/ Universitas Brawijaya. Tugas Akhir

Nabika, T., Ohara, H., Kato, N., Isomura, M., 2012. The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: Still a useful model for post-GWAS genetic studies? *Hypertens. Res.*, **35**(5):477–484.

Nakano, A., Inoue, N., Sato, Y., Nishimichi, N., Takikawa, K., et al, 2010. LOX-1 mediates vascular lipid retention under hypertensive state. *J. Hypertens.*, **28**(6):1273–80.

Nakano, S., Sugihara, M., Yamada, R., Katayanagi, K., Tate, S., 2012. Structural implication for the impaired binding of W150A mutant LOX-1 to oxidized low density lipoprotein, OxLDL. *Biochim. Biophys. Acta*, **1824**(5):739–49.

Nascimento, I.P., Leite, L.C.C., 2012. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **45**(12): 1102–1111.

Navarra, T., Turco, S. Del, Berti, S., Basta, G., 2010. The Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 and its Soluble Form : Cardiovascular Implications. , *J. Atheros Thrombosis*: 317–331.

Sheets, R. L., Stein, J., Manetz, T. S., Duffy, C., Nason, M., Andrews, C., Kong, W-P., Nabel, G.J., Gomez, P. L. 2006. Biodistribution of DNA Plasmid Vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile Virus Is Similar, without Integration, despite Differing Plasmid Backbones or Gene Inserts. *Toxicol Sci.* **91**(2), 610–619.

Nikcevic, G., Kovacevic-Grujicic, N., Stevanovic, M., 2003. Improved transfection efficiency of cultured human cells. *Cell Biol Int.*, **27** (2003):735–737

Ogata, J., Fujishima, M., Tamaki, K., Nakatomi, Y., Ishitsuka, T., Omae, T., 1982. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an experimental model of malignant hypertension - A pathological study. *A Pathol. Anat. Histol.*, **394**(3): 185–194.

Ohki, I., Ishigaki, T., Oyama, T., Matsunaga, S., Xie, Q., Ohnishi-Kameyama, M., Murata, T., Tsuchiya, D., Machida, S., Morikawa, K., Tate, S. I. 2005. Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL. *Structure*, **13**(6), 905–917.

Ogura, S., Kakino, A., Sato, Y., Fujita, Y., Iwamoto, S., Otsui, K., Yoshimoto R., Sawamura, T., 2009. LOX-1: The Multifunctional Receptor Underlying Cardiovascular Dysfunction, *Circulation Journal*. **73**(November), 1993–1999.

Okamoto, K., Aoki, K., 1963. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn. Circ. J.*, **27**(3):282–293.

Pasetti, M. F., Simon, J.K., Szein, M.B., Levin M.M., 2011, Immunology of Gut Mucosal Vaccine, *Immunol Rev.* **14**(4):384–399.

Packard, R.R.S., Libby, P., 2008. Inflammation in atherosclerosis: From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin. Chem.*, **54**:24–38.

Park, H., Adsit, F.G., Boyington, J.C., 2005. The 1.4 Å Crystal Structure of the Human Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor Lox-1, *J. Biol. Chem.* **280**(14):13593–13599.

Parhusip, Y.M. 2017. Pengaruh Vaksin DNA Epitop Lox-1 Terhadap Aktivasi Nuclear Factor Kappa Beta (Nf-Kb) Pada Aorta Jantung Rattus Norvegicus Dengan Diet Aterogenik. Tugas Akhir. Program Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.

Pereira, V.B., Santiago, M., Azevedo, P., Diniz, T., Saraiva, L., Souza B.M., Turk M.Z.; De Castro C.P.; Agresti, P.M.; Lima, A. F., Azevedo V., Pontes D.S., Miyoshi A., 2013. Use of bacteria in DNA vaccine delivery. *Formatex*: 993–2003.

Petrovan, R.J., Kaplan, C.D., Reisfeld, R. a, Curtiss, L.K., 2007. DNA vaccination against VEGF receptor 2 reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**(5):1095–100.

Pirillo, A., Norata, G.D., Catapano, A.L., 2013. LOX-1 , OxLDL , and Atherosclerosis. , *Med. Inflamm.*, 2013.

Pontes, D.S., de Azevedo, M.S.P., Chatel, J.-M., Langella, P., Azevedo, V., Miyoshi, A., 2011. Lactococcus lactis as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr. Purif.*, **79**(2):165–175.

Pravenec, M., Křen, V., Landa, V., Mlejnek, P., Musilová, Šilhavý J., Šimáková, M., Zídek V., 2014. Recent progress in the genetics of spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Res.*, 63 Suppl 1: S1-8.

Pravenec, M., Kurtz, T.W., 2010. Recent advances in genetics of the spontaneously hypertensive rat. *Curr. Hypertens. Rep.*, **12**(1):5–9.

Pringle, I.A., Hyde, S.C., 2009. Progress and Prospects: The design and production of plasmid vectors. , *Gene Ther*: 165–171.

Ramirez, V.J.E., Sharpe, L.A., Peppas, N.A., 2017. Current state and challenges in developing oral vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 114: 116–131.

Radziwill-Bienkowska, J.M., Le, D.T.L., Szczesny, P., Duviau, M.P., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Loubière P., Mercier-Bonin M., Bardowski J.K., Kowalczyk M., 2016. Adhesion of the genome-sequenced Lactococcus lactis subsp. cremoris IBB477 strain is mediated by specific molecular determinants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **100**(22):9605–9617.

Radziwill-Bienkowska, J.M., Zochowska, D., Bardowski, J., Mercier-Bonin, M., Kowalczyk, M., 2014. Lactococcus lactis IBB477 presenting adhesive and



muco-adhesive properties as a candidate carrier strain for oral vaccination against influenza virus. *Acta Biochim. Pol.*, **61**(3):603–607.

Robinson, J.G., Fox, K.M., Bullano, M.F., Grandy, S., 2009. Atherosclerosis profile and incidence of cardiovascular events: a population-based survey. *BMC Cardiovasc. Disord.*, 9:46.

Rodríguez-Saldaña, J., Rodríguez-Flores, M., Cantú-Brito, C., Aguirre-García, J., 2014. A pathological study of the epidemiology of atherosclerosis in Mexico city. *Cardiol. Res. Pract.*, 2014;264205.

Ross R. 1999. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* **1999**; 340:115–126

Rudijanto, A., The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med. Indones.*, **39**(2):86–93.

Russell, J.C., Proctor, S.D., 2006. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.*, **15**(6):318–330.

de Ruyter, P.G., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(10): 3662–3667.

Sáez, D., Fernández, P., Rivera, A., Andrews, E., Oñate, A., 2012. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine*, **30**(7):1283–1290.

Sangle, G. V, Zhao, R., Shen, G.X., 2008. Transmembrane signaling pathway mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, **295**(5):E1243–E1254.

Sawamura, T., Kume, N., Aoyama T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Alba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita T., Masaki, T., 1997. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*. **36** (386): 73-77

Sawamura, T., 2004. LOX-1, a lectin-like oxidized LDL receptor identified form endothelial cells, in endothelial dysfunction. *Int. Congr. Ser.*, **1262**:531–534.

Sawamura, T., Wakabayashi, I., Okamura, T., 2015. LOX-1 in atherosclerotic disease. *Clin. Chim. Acta*, **440**:157–163.

Seimon, T., Tabas, I., 2009. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J. Lipid Res.*, 50 Suppl: S382–S387.

- Shah, P.K., Chyu, K.-Y., Dimayuga, P.C., Nilsson, J., 2014. Vaccine for atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **64**(25):2779–91.
- Shahabi, V., Maciag, P.C., Rivera, S., Wallecha, A., 2010. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng. Bugs*, **1**(4):235–239.
- Shigemori, S., Shimosato, T., 2017. Applications of genetically modified immunobiotics with high immunoregulatory capacity for treatment of inflammatory bowel diseases. *Front. Immunol.*, **8**.
- Shigemori, S., Watanabe, T., Kudoh, K., Ihara, M., Nigar, S., et al, 2015. Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice. *Microb. Cell Fact.*, **14**(1):189.
- Shigemori, S., Yonekura, S., Sato, S., Otani, H., Shimosato, T. 2015. Expression of the immunoreactive buckwheat major allergenic storage protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **97**:3603–3611.
- Shigemori, S., Yonekura, S., Sato, T., Nakanishi, M., Otani, H., Shimosato, T., 2012. Expression of a Biologically Active GFP-aS1-Casein Fusion Protein in *Lactococcus lactis*. *Curr Microbiol.*, **64**: 569-575.
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita T, Yoehara S., 2001. LOX-1 Supports Adhesion of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *J. Immunol.*, **166**(8) :5108–5114.
- da Silva, A.J., Zangirolami, T.C., Novo-Mansur, M.T.M., de Campos Giordano, R., Martins, E.A.L., 2014. Live bacterial vaccine vectors: An overview. *Brazilian J. Microbiol.*, **45**(4):1117–1129.
- Sinha, S., Kuo, C.Y., Ho, J.K., White, P.J., Jazayeri, J.A., Pouton, C.W., 2017. A suicidal strain of *Listeria monocytogenes* is effective as a DNA vaccine delivery system for oral administration. *Vaccine*, **35**(38):5115–5122.
- De Siqueira, J., Abdul Zani, I., Russell, D.A., Wheatcroft, S.B., Ponnambalam, S., Homer-Vanniasinkam, S., 2015. Clinical and Preclinical Use of LOX-1-Specific Antibodies in Diagnostics and Therapeutics. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **8**(8):458–465.
- Snapp, E., 2005. Design and Use of Fluorescent Fusion Proteins in Cell Biology. *Curr Protoc Cell Biol.* 2005:1-17.
- Soboleski, M.R., Oaks, J., Halford, W.P., 2005. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells, *FASEB*. **19**(3):440–442.
- Song, P., He, S., Zhou, A., Lv, G., Guo, J., Zhuo, J., Han, Y., Zhuo, H., Hao, Z., Cong, H., 2017. Vaccination with toxofilin DNA in combination with an alum-

- monophosphoryl lipid A mixed adjuvant induces significant protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *BMC Infect. Dis.*, **17**(1):1–11.
- Sugimoto, K., Ishibashi, T., Sawamura, T., Inoue, N., Kamioka, M., Uekita, H., Ohkawara, H., Sakamoto, T., Sakamoto, N., Okamoto, Y., Takuwa Y., Kakino, A., Fujita, Y., Tanaka, T., Teramoto, T., Maruyama, Y., Takeishi, Y. 2009. LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells, *Cardiovas. Res.*: 27–136
- Sun, Y., Chen, X., 2011. Ox-LDL-induced LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **25**(5):572–9.
- Sztraj, K., Szczepankowska. K., Chmielewska-Jeznach, M., 2017. Lactic acid bacteria — promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *J. Appl. Microbiol.*, **123**(2):325–339.
- Tabar, M.S., Hesaraki, M., Esfandiari, F., Samani, S.F., Vakilian, H., Baharvand, H., 2015. Evaluating Electroporation and Lipofectamine Approaches for Transient and Stable Transgene Expressions in Human Fibroblasts and Embryonic Stem Cells., *Cell J.* **17**(3):438–450.
- Takeshita, F., & Ishii, K. J. 2008. Intracellular DNA sensors in immunity, *Curr. Op. Immunol.* 383–388
- Tannock, L.R., King, V.L., 2010. Animal models of atherosclerosis: More than mice. *Atherosclerosis*, **212**(1):32–33.
- Tate, S., Agency, T., 2006. Structure and mode of ligand recognition of the oxidized LDL receptor, LOX-1. *Structure*, **661**(2):179–198.
- Ulmer, J.B., Dewitt, C.M., Chastain, M., Friedman, Donnelly, J.J., McClements W.L., Caulfield, M.J., Bohannon, K.E., Volkin D.B., Evans, R.K., 1999. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. *Vaccine*, **18**:18–28.
- Unterholzner, L., 2013. The interferon response to intracellular DNA: Why so many receptors? *Immunobiol.*, **218**(11):312–1321.
- Urbancic, S., Kolar, M.H., Dimitrijevic, D., Demsar, L., Vidrih, R., 2014. Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying. *Food Sci. Technol.*, **57**(2):671–678.
- Wang, S., Kong, Q., Curtiss, R., 2013. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb. Pathog.*, **58**:17–28.

Westerweel, P. E., Verhaar, M.C., 2010. LOX-1: Luring ox-LDL into the arterial wall. *J Hypertens.* **2010.** (28):1127–1128

Williams, J., 2013. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. *Vaccines*, **1(3)**:225–249.

Williams, J. A., Carnes, A.E., Hodgson, C.P., 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.*, **27(4)**:353–370.

Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, **39(1)**: 75–85.

Wyszyńska, A., Kobierecka, P., Bardowski, J., Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2015. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99(7)**:2967–2977.

Xia, W., Bringmann, P., McClary, J., Jones, P.P., Manzana, W., 2006. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expr. Purif.*, **45(1)**:115–124.

Xiangdong, L., Yuanwu, L., Hua, Z., Liming, R., Qiuyan, L., Li. N., 2011. Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein Cell*, **2(3)**:189–201.

Xin, K.Q., Hoshino, Y., Toda, Y., Igimi, S., Kojima, Y., Jounai, N., Ohba, K., Kushiro, A., Kiwaki, M., Hamajima, K., Klinman, D., Okuda K., 2003. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Blood*, **102(1)**:223–228.

Xu, X., Gao, X., Potter, B.J., Cao, J.M., Zhang, C., 2007. Anti-LOX-1 rescues endothelial function in coronary arterioles in atherosclerotic ApoE knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27(4)**:871–877.

Xu, S., Ogura, S., Chen, J., Little, P.J., Moss, J. Liu, P.J., 2013. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **70(16)**: 2859–2872.

Yagnik, B., Padh, H., Desai, P., 2016. Construction of a new shuttle vector for DNA delivery into mammalian cells using non-invasive *Lactococcus lactis*. *Microbes Infect.*, **18(4)**:237–24.

Yagnik, B., Sharma, D., Padh, H., Desai, P., 2017. Dual recombinant *Lactococcus lactis* for enhanced delivery of DNA vaccine reporter plasmid pPERDBY. *Microbiol. Immunol.*, **61(3–4)**:23–129.

Yamori Y., Hamashima Y., Horie R., Handa H., Sato M., 1975. Pathogenesis of Spontaneous Hypertension as a Model for Essential Hypertension. *Japanese Circulation Journal*.61:601-609

Yang, X.F., Jan, M., Meng, S., Chen, N.C., Mai, J., Wang, H., 2010. Inflammatory and autoimmune reactions in atherosclerosis and vaccine design informatics. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010.

Yoshimoto, R., Fujita, Y., Kakino, A., Iwamoto, S., Takaya, T., Sawamura, T. 2011. The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **25**(5):379–91.

Yurina, V., 2018. Live Bacterial Vectors — A Promising DNA Vaccine Delivery System. *Med Sci*:1–12.

Yurina, V., Yudani, T., Raras, M., Rudiyanto, A., Lyrawati, D., Handono, K., 2017. Design and construction of DNA vaccine expressing lectin-like oxidize- LDL receptor-1 (LOX-1) as atherosclerosis vaccine candidate., *J Biotech Res*. **8**(1):103–112.

Zarrin, A.A., Malkin, L., Fong, I., Luk, K.D., Ghose, A., 1999. Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and V V 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1446: 135–139.

Zhang Q-X., Zhong J., Huan L-D., 2011. Expression of hepatitis B virus surface antigen determinants in *Lactococcus lactis* for oral vaccination. *Microbiol Res*. 166 (2): 111-120

Lampiran 1.
Persetujuan Etik untuk Penelitian Tahap I



UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 248 / EC / KEPK / 06 / 2016

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Analisa Potensi Vaksin DNA Epitop LOX-1 dalam Mencegah Aterosklerosis Melalui Induksi Respon Imun pada Tikus Rattus Novergicus Strain Wistar

PENELITI : Valentina Yurina, S.Si.,M.Si
Efta Triastuti, M.Farm. Klin.,S.Si.,Apt
Ema Pristi Y, M.Farm. Klin., S.Farm.,Apt

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmasi Klinik Program Studi Farmasi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang, 16 JUN 2016
Ketua,
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K), M.Hum
NIP. 19460516 197111 1 001



Lampiran 2

Data Sekuen rat LOX-1 dari NCBI

***Rattus norvegicus* oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1, mRNA (cDNA clone MGC:114271 IMAGE:7458637), complete cds**

GenBank: BC097290.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS BC097290 2985 bp mRNA linear ROD 17-JUL-2006

DEFINITION *Rattus norvegicus* oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1, mRNA (cDNA clone MGC:114271 IMAGE:7458637), complete cds.

ACCESSION BC097290

VERSION BC097290.1

KEYWORDS MGC.

SOURCE *Rattus norvegicus* (Norway rat)

ORGANISM *Rattus norvegicus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2985)

AUTHORS Strausberg,R.L., Feingold,E.A., Grouse,L.H., Derge,J.G., Klausner,R.D., Collins,F.S., Wagner,L., Shenmen,C.M., Schuler,G.D., Altschul,S.F., Zeeberg,B., Buetow,K.H., Schaefer,C.F., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Jordan,H., Moore,T., Max,S.I., Wang,J., Hsieh,F., Diatchenko,L., Marusina,K., Farmer,A.A., Rubin,G.M., Hong,L., Stapleton,M., Soares,M.B., Bonaldo,M.F., Casavant,T.L., Scheetz,T.E., Brownstein,M.J., Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Prange,C., Raha,S.S., Loquellano,N.A., Peters,G.J., Abramson,R.D., Mullahy,S.J., Bosak,S.A., McEwan,P.J., McKernan,K.J., Malek,J.A., Gunaratne,P.H., Richards,S., Worley,K.C., Hale,S., Garcia,A.M., Gay,L.J., Hulyk,S.W.,

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Unive: Villalón,D.K., Muzny,D.M., Sodergren,E.J., Lu,X., Gibbs,R.A., 'a
 Unive: Fahey,J., Helton,E., Kettelman,M., Madan,A., Rodrigues,S., 'a
 Unive: Sanchez,A., Whiting,M., Madan,A., Young,A.C., Shevchenko,Y., 'a
 Unive: Bouffard,G.G., Blakesley,R.W., Touchman,J.W., Green,E.D., 'a
 Universitas Brawijaya: Dickson,M.C., Rodriguez,A.C., Grimwood,J., Schmutz,J., 'a
 Universitas Brawijaya: Myers,R.M., Butterfield,Y.S., Krzywinski,M.I., Skalska,U., 'a
 Universitas Brawijaya: Smailus,D.E., 'a
 Unive: Schnerch,A., Schein,J.E., Jones,S.J. and Marra,M.A. 'a
 Unive: CONSRTM Mammalian Gene Collection Program Team 'a
 Unive: TITLE Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length 'a
 Unive: human and mouse cDNA sequences 'a
 Unive: JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002) 'a
 Unive: PUBMED [12477932](#) 'a
 Unive: REFERENCE 2 (bases 1 to 2985) 'a
 Unive: CONSRTM NIH MGC Project 'a
 Unive: TITLE Direct Submission 'a
 Unive: JOURNAL Submitted (01-JUN-2005) National Institutes of Health, Mammalian 'a
 Unive: Gene Collection (MGC), Bethesda, MD 20892-2590, USA 'a
 Unive: REMARK NIH-MGC Project URL: <http://mgc.nci.nih.gov> 'a
 Unive: COMMENT Contact: MGC help desk 'a
 Unive: Email: cgapbs-r@mail.nih.gov 'a
 Unive: Tissue Procurement: Dr. Josef Lazar, Dr. Howard J. Jacob, 'a
 Unive: Medical College of Wisconsin 'a
 Unive: cDNA Library Preparation: Open Biosystems 'a
 Unive: cDNA Library Arrayed by: The I.M.A.G.E. Consortium (LLNL) 'a
 Unive: DNA Sequencing by: Sequencing Group at the Stanford Human Genome 'a
 Universitas Brawijaya: Center, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 'a
 Universitas Brawijaya: 94305 'a
 Unive: Web site: <http://www-shgc.stanford.edu> 'a
 Unive: Contact: (Dickson, Mark) mcd@paxil.stanford.edu 'a
 Unive: Dickson, M., Schmutz, J., Grimwood, J., Rodriguez, A., and 'a
 Unive: Myers,R. M. 'a
 Universitas Brawijaya: Clone distribution: MGC clone distribution information can be 'a
 Universitas Brawijaya: found through the I.M.A.G.E. Consortium/LLNL at: 'a
 Universitas Brawijaya: <http://image.llnl.gov> 'a
 Unive: Series: IRAK Plate: 227 Row: j Column: 19 'a
 Unive: This clone was selected for full length sequencing because it 'a
 Universitas Brawijaya: Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

passed the following selection criteria: matched mRNA gi:
18959247.

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..2985
                        /organism="Rattus norvegicus"
                        /mol_type="mRNA"
                        /db_xref="taxon:10116"
                        /clone="MGC:114271 IMAGE:7458637"
                        /tissue_type="Placenta, day 21 of pregnancy, pooled 2."
                        /clone_lib="NIH_MGC_269"
                        /lab_host="DH10B"
                        /note="Vector: pExpress1"
     gene              1..2985
                        /gene="Oldlr1"
                        /gene_synonym="LOX-1"
                        /gene_synonym="Oldr1"
                        /gene_synonym="Olr1"
                        /db_xref="GeneID:140914"
                        /db_xref="RGD:620515"
     CDS                45..1139
                        /gene="Oldlr1"
                        /gene_synonym="LOX-1"
                        /gene_synonym="Oldr1"
                        /gene_synonym="Olr1"
                        /codon_start=1
                        /product="oxidized low density lipoprotein (lectin-
like)
                        receptor 1"
                        /protein_id="AAH97290.1"
                        /db_xref="GeneID:140914"
                        /db_xref="RGD:620515"
                        /translation="MAFDDKMKPVNGQPDQKSCGKKPKGLHLLSSTWWCPAAVTLAIL
CLVLSVTLIVQQTQLLQVSDLLKQYQANLTQQDHILEGQMSAQKKAENASQESKRELK
EQIDTLTWKLNEKSKEQEKLQQNQNQLQEALQRAVNASEESKWELKEQIDILNWKLNG
ISKEQKELLQQNQNQLQEALQKAEKYSEESQRELKEQIDTLSWKLNESKEQEELLQQN
QNLQEALQRAANSSGPCPDWIWHKENCYLFHGPFPNWEKSRENCLSLDAQLLQISTTD
DLNFVQLQATSHSTS PFWMGLHRKNPNHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCA
    
```

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

YIQGGVVFAENCILTAFSICQKKANLLLTQ"

ORIGIN

1 gtcctctact gtttcagttt cccattcttg gcatgaatth ggaaatggct tttgatgaca
61 agatgaagcc tgtgaatggc cagcctgacg agaagtcag tggcaagaag cctaaagggc
121 tgcatttgct ttcttcaca tggtggtgcc ctgctgctgt gactctggcc atcctttgcc
181 tagtgttatc agtgaccctt attgtacagc agacacagtt actccaggta tctgacctcc
241 taaagcaata ccaagcaaac cttactcagc aggatcatat cctggagggg cagatgtcag
301 cccagaagaa agcagaaaat gcttcacaag aatcaaagag ggaactgaag gaacagatag
361 acacctcac ctggaagcta aacgagaaat ccaaagagca ggagaagctt ctgcagcaga
421 atcagaacct ccaagaagcc ctgcagagag ctgtgaacgc ttcagaggag tccaagtggg
481 aactgaagga acaaatagac attctcaact ggaagctgaa tgggatatcc aaagagcaga
541 aggagcttct gcagcagaat cagaacctcc aagaagccct gcagaaagct gagaaatatt
601 cagaggagtc ccagagagaa ctgaaggaac agatagacac cctcagctgg aagctaaacg
661 agaaatcaa agagcaggag gagcttctgc agcagaatca gaatcttcaa gaagccctgc
721 agagagctgc aaactcttca ggtccttgtc cacaagactg gatctggcat aaagaaaact
781 gttacctctt ccatggggcc ttaactggg aaaaaagtcg ggagaattgc ctatctttag
841 atgccagtt actacaaatt agtaccacag atgatctgaa cttcgtctta caagcaactt
901 cccattccac ctccccattt tggatgggat tacatcggaa aaatcccaac caccatggc
961 tatgggagaa cggctctcct ttgagttttc aattctttag gaccaggggc gtttctttac
1021 agatgtactc atcaggcacc tgtgcatata ttcaaggagg agttgtgttt gctgaaaact
1081 gcattttaac tgcattcagc atatgtcaga agaaggcaaa tttattgcta actcagtgaa
1141 actaaggatt ctggagaaga acaggagaag acctttaact gttgttttga aatttaagct
1201 atcctttctt ggggtgtaaa catgtggcct tgacagctgt cagttacttt ctaactgcag
1261 ttcacctcaa cagagacaaa gaccagaagc aaaaaccgg gggtcagct gatggcatct
1321 ttgtatcaaa agttgtgaat tcaattgttt atccatgtac actggccccg ccctcccaa
1381 gactcccaac caactgcaa tctttttttt ctttctgtt taaactatg cctcctgtct
1441 gacctggggg atgctttctg ctcaatttcc tctacctcag gtatgccttc tgttgctgca
1501 tgaaagacag aatgtagaaa accttcttca agtgcaggca gagagctcaa agttaaaaac
1561 atgcctaaga aatagcatgc aaagaaacag aactggaaaa gctacactgt acgcaggagc
1621 tcatggtctc taaaagcta tggcttgatc ttcacgactt gggtcctct ccagactgca
1681 ccatttacac atttatgttt tttattttta tttttattgt gtgtttatgg atagttggcc
1741 tatatgtatc tctgtgtacc acatgagtgt ctccattcag aagagggcat cagattctct
1801 gaaactggaa ctgcagatgg ctgtaagcta ctacatagat gtaaagaatt gaattcatgt
1861 cctctgaaag aacagtcagt actcttaacc atgaactatt tctccaggtc ccgtgatcat
1921 ttctgtatc agctatttct tcacatttgc tctaccaaag aacagagctt aaacagtat
1981 tttataaagc catagaatat ggccccaaaa caaaactaga atttttccct taaattgcat
2041 actttgtaga cagtctctcc ttgacctgc catgcatgc tatgacttag aaacatacat

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Lampiran 3

Data Sekuen eGFP dari NCBI

**Synthetic construct EGFP gene, complete sequence, Clone_id:
SNGD_293T_biEGFPcC>G_006**

GenBank: LC336974.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS LC336974 721 bp DNA linear SYN 10-FEB-2018

DEFINITION Synthetic construct EGFP gene, complete sequence, Clone_id:
SNGD_293T_biEGFPcC>G_006.

ACCESSION LC336974

VERSION LC336974.1

KEYWORDS .

SOURCE synthetic construct

ORGANISM synthetic construct

other sequences; artificial sequences.

REFERENCE 1

AUTHORS Nakajima,K., Zhou,Y., Tomita,A., Hirade,Y., Gurumurthy,C.B. and
Nakada,S.

TITLE Precise and efficient nucleotide substitution near genomic nick
via noncanonical homology-directed repair

JOURNAL Genome Res. 28 (2), 223-230 (2018)

PUBMED 29273627

REMARK DOI:10.1101/gr.226027.117

REFERENCE 2 (bases 1 to 721)

AUTHORS Nakada,S., Nakajima,K., Zhou,Y., Tomita,A., Hirade,Y. and
Gurumurthy,C.B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-NOV-2017) Contact:Shinichiro Nakada Osaka
University,

Graduate School of Medicine; Yamadaoka 2-2, Suita, Osaka 565-
0871,
Japan

COMMENT EGFPcC>G reporter sequence in single-cell clones after gene
editing.

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

```

FEATURES
    source          1..721
                   /organism="synthetic construct"
                   /mol_type="other DNA"
                   /db_xref="taxon:32630"
                   /note="Clone_id: SNGD_293T_biEGFPcC>G_006;
                   Reporter_cell: 293T_bi-EGFPcC>G;
                   Sequenced_reporter: tagBFP-P2A-EGFP"
    gene            1..721
                   /gene="EGFP"
    misc feature    1..721
                   /gene="EGFP"
                   /note="corrected"

```

ORIGIN

```

1  tatggtgagc aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga
61  cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta
121 cggcaagctg accctgaagt tcactctgcac caccggcaag ctgcccctgc cctggcccac
181 cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa
241 gcagcacgac ttcttcaagt cgcctatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt
301 cttcaaggac gacggcaact acaagaccgg cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct
361 ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca tcttggggca
421 caagctggag tacaactaca acagccacaa cgtctatatc atggccgaca agcagaagaa
481 cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc
541 cgaccactac cagcagaaca cccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca
601 ctacctgagc acccagtcgg cctgagcaa agaccccac gagaagcgcg atcacatggt
661 cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta
721 a

```

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Lampiran 4

Hasil Sekuensing pLOX-1 dan pGFP-LOX-1

Sekuen pcDNA3.1-GFP-LOX-1 dengan primer GFP forward

```

aGTTACTACAanTTAGTACCACAGATGATCTGAACTTCGTCTTACAAGCAACTTCCCATTCC
ACCTCCCATTTTGGATGGGATTACATCGGAAAAATCCCAACCACCCATGGCTATGGGAGAA
CGGCTCTCCTTTGAGTTTTCAATTCTTTAGGACCAGGGGCGTTTCTTTACAGATGTACTION
CAGGCACCTGTGCATATATTCAAGGAGGAGTTGTGTTTGCTGAAAACCTGCATTTTAACTGCA
TTCAGCATATGTCAGAAGAAGGCAAATTTATTGCTAACTCAGGGATCCGTGAGCAAGGGCGA
GGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA
AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTC
ATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCCTACGG
CGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCA
TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC
CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA
CTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGgCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAAC
ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCAGCG
CCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGanTtCGTGACCGCCGCCGGGgATCACTCTCGGC
ATGGACGAgCTGTACAAGTGAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTcGantCTanaGGgCCc
GTTtAAaCCcGCTGATCAGCCTcGactgTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTtgCCc
cnCCCnGTGCCTTCCTTgACcnTGGAagg
    
```



Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Synthetic construct EGFP gene, complete sequence, Clone_id: SNGD_293T_biEGFPcC>G_006
 Sequence ID: [LC336974.1](#) Length: 721 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1317 bits(713)	0.0	714/715(99%)	0/715(0%)	Plus/Plus
Query 17	GTGAGCAAGGGGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCTCATCTTGGTGGAGCTGGACGGC			76
Sbjct 5	GTGAGCAAGGGGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCTCATCTTGGTGGAGCTGGACGGC			64
Query 77	GACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGGAGGGGCGAGGGGATGCCACCTACGGC			136
Sbjct 65	GACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGGAGGGGCGAGGGGATGCCACCTACGGC			124
Query 137	AAGCTGACCTGAAGTTTCATCTGCACCACGGGCAAGTCCCGCTGCCCTGGGCCACCTCT			196
Sbjct 125	AAGCTGACCTGAAGTTTCATCTGCACCACGGGCAAGTCCCGCTGCCCTGGGCCACCTCT			184
Query 197	GTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTCTTACGCCGCTACCCGACCATGAAGCAG			256
Sbjct 185	GTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTCTTACGCCGCTACCCGACCATGAAGCAG			244
Query 257	CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGACGACCATCTTCTTC			316
Sbjct 245	CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGACGACCATCTTCTTC			304
Query 317	AAGGACGACGGCACTACAAGACCAGCCGCGGAGGTGAAGTTGAGGGGACACCTGGTG			376
Sbjct 305	AAGGACGACGGCACTACAAGACCAGCCGCGGAGGTGAAGTTGAGGGGACACCTGGTG			364
Query 377	AACCGCATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAG			436
Sbjct 365	AACCGCATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAG			424
Query 437	CTGGAGTACAACACAAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAGCAAGAAGACGGC			496
Sbjct 425	CTGGAGTACAACACAAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAGCAAGAAGACGGC			484
Query 497	ATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCTGACCTGCCGAC			556
Sbjct 485	ATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCTGACCTGCCGAC			544
Query 557	CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGTCTGCTGCCGACCAACCTAC			616
Sbjct 545	CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGTCTGCTGCCGACCAACCTAC			604
Query 617	CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAAGCAGGAGCGCATGACATGGTCTCTG			676
Sbjct 605	CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAAGCAGGAGCGCATGACATGGTCTCTG			664
Query 677	CTGGANTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGATGGACGAGCTGTACAAGT			731
Sbjct 665	CTGGANTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGATGGACGAGCTGTACAAGT			719

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

Green fluorescent protein [Fusarium fujikuroi]
 Sequence ID: [SCV58932.1](#) Length: 242 Number of Matches: 1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
459 bits(1182)	6e-163	Compositional matrix adjust.	237/238(99%)	237/238(99%)	0/238(0%)	+2
Query 17	VSKGEEELFTGWVPIVLELDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLKTLKFICTTGLKLPVWPNTL					196
Sbjct 2	VSKGEEELFTGWVPIVLELDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLKTLKFICTTGLKLPVWPNTL					61
Query 197	vttltYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAPEGVVQERTIFFKDDGNIYKTRAEVFFEGDTLV					376
Sbjct 62	VTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAPEGVVQERTIFFKDDGNIYKTRAEVFFEGDTLV					121
Query 377	NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYINSHNYVMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD					556
Sbjct 122	NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYINSHNYVMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD					181
Query 557	HYQONTPIGDGPVLLPDNIHYLSTQSALSKDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK					730
Sbjct 182	HYQONTPIGDGPVLLPDNIHYLSTQSALSKDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK					239

Sekuen pcDNA3.1-GFP-LOX-1 dengan primer GFP reverse

cngaTGGGGgtgTTCTGCTGGtagTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTG
 GCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTTCGGCCATGATATAGACGTTGT
 GGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATG
 CCCTTCAGCTCGATGCGGTTACCCAGGGTGTCCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTT
 GTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGG
 ACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAG
 GTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACCTT


```

CAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGC
CGTTTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCC
TTGCTCACGGATCCCTGAGTTAGCAATAAATTTGCCCTTCTTCTGACATATGCTGAATGCAGT
TAAAAATGCAGTTTTTCAGCAAACACAACCTCCTCCTGAATATATGCACAGGTGCCTGATGAGT
ACATCTGTAAAGAAACGCCCCcTGGTCCTAAAGAATTGAAAACCTCAAAGGAGAGCCGTTCTCC
CATAGCCATGGGTGgTttGGgaTTTTtCCGATGTAATCCCATCCAAAATggggngnTGGAn
ggnAaGTTGCTTgtnnGACGAAGTTCAGAtcaTCTGTGGtnnnAAttgTAGTAantGGgcA
tCTaaagATAGGCAaTtctc
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Synthetic construct EGFP gene, complete sequence, Clone_id: SNGD_293T_biEGFPc>G_006
 Sequence ID: [LC336974.1](#) Length: 721 Number of Matches: 1

Range 1: 5 to 559 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1026 bits(555)	0.0	555/555(100%)	0/555(0%)	Plus/Minus
Query 1	GTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCCTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTT	60			
Sbjct 559	GTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCCTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTT	500			
Query 61	GAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTT	120			
Sbjct 499	GAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTT	440			
Query 121	GTAGTTGTAAGTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGCTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTT	180			
Sbjct 439	GTAGTTGTAAGTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGCTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTT	380			
Query 181	CAGCTCGATGCGGTTTACCAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGGGGCTTGTGA	240			
Sbjct 379	CAGCTCGATGCGGTTTACCAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGGGGCTTGTGA	320			
Query 241	GTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGA	300			
Sbjct 319	GTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGA	260			
Query 301	CTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCAATGTTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTA	360			
Sbjct 259	CTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCAATGTTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTA	200			
Query 361	GGTCAGGGTGGTACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCTGGTGGTGCAGATGAA	420			
Sbjct 199	GGTCAGGGTGGTACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCTGGTGGTGCAGATGAA	140			
Query 421	CTTCAGGGTCAGCTTGGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTT	480			
Sbjct 139	CTTCAGGGTCAGCTTGGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTT	80			
Query 481	GTGGCCGTTTACGTCGCCGTCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTC	540			
Sbjct 79	GTGGCCGTTTACGTCGCCGTCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTC	20			
Query 541	CTCGCCCTTGCTCAC	555			
Sbjct 19	CTCGCCCTTGCTCAC	5			

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

enhanced green fluorescent protein [synthetic construct]
 Sequence ID: [ADQ48006.1](#) Length: 268 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 186 [GenPept](#) [Graphics](#)

Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
353 bits(907)	2e-120	Compositional matrix adjust.	185/185(100%)	185/185(100%)	0/185(0%)	-2
Query 555	VSKGEELFTGVVPIVLVDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVWPPTL					376
Sbjct 2	VSKGEELFTGVVPIVLVDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVWPPTL					61
Query 375	VTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV					196
Sbjct 62	VTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV					121
Query 195	NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGGSVQLAD					16
Sbjct 122	NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGGSVQLAD					181
Query 15	HYOQN 1					
Sbjct 182	HYOQN 186					

Sekuen pcDNA3.1-LOX-1 dengan primer LOX-1 forward

```
aGagAagTGCTTGTCTTTGGATGccAaGTTGCTGAAAaTtAATAGCACAGCTGATCTGGACT
TCATCCAGCAAGCAATTTCCCTATTCCAGTTTTCCATTTCTGGATGGGGCTGTCTCGGAGGAAC
CCCAGCTACCCATGGCTCTGGGAGGACGGTTCTCCTTTGATGCCCCACTTATTTAGAGTCCG
AGGCGCTGTCTCCCAGACATAACCTTCAGGTACCTGTGCATATATACAACGAGGAGCTGTTT
ATGCGGAAAACACTGCATTTTAGCTGCCTTCAGTATATGTCAGAAGAAGGCAAACCTAAGAGCA
CAGTGAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTTAAACCCGCTGA
TCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTC
CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCATAAAAATGAGGAAATTGCATCGC
ATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGggTGGgnTGGGGCAGGACAGCAAGGGGA
GGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGG
AAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCG
GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCC
TTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATC
GGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCcAAAAAaCTTGAT
TAGGGTGATGGTTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTT
GGAGTCCACGTTCTTTAaTAgTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCT
CGGTCTATTCTTTTGATTtATAAGGGaTTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAaTGAG
CTGATTtAACAAAAaTTtAACGnnAATTAATtctgtGGAangt
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Rattus norvegicus oxidized low density lipoprotein receptor 1 (Olr1), mRNA

Sequence ID: [NM_133306.2](#) Length: 3751 Number of Matches: 1

Range 1: 815 to 1186 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	688 bits(372)	0.0	372/372(100%)	0/372(0%)	Plus/Minus
Query 36	TCACTGAGTTAGCAATAAATTTGCCCTTCTTGACATATGCTGAATGCAGTTAAATGCA				95
Sbjct 1186	TCACTGAGTTAGCAATAAATTTGCCCTTCTTGACATATGCTGAATGCAGTTAAATGCA				1127
Query 96	GTTTTTCAGCAAAACACAACCTCCTCCTTGAATATATGCACAGGTGCCGTGATGAGTACATCTG				155
Sbjct 1126	GTTTTTCAGCAAAACACAACCTCCTCCTTGAATATATGCACAGGTGCCGTGATGAGTACATCTG				1067
Query 156	TAAAGAAACGCCCTTGGTCCATAAGAATTGAAAACCTCAAAGGAGAGCCGTTCTCCCATAG				215
Sbjct 1066	TAAAGAAACGCCCTTGGTCCATAAGAATTGAAAACCTCAAAGGAGAGCCGTTCTCCCATAG				1007
Query 216	CCATGGGTGGTTGGGATTTTTCCGATGTAATCCCATCCAAAATGGGGAGGTGGAATGGGA				275
Sbjct 1006	CCATGGGTGGTTGGGATTTTTCCGATGTAATCCCATCCAAAATGGGGAGGTGGAATGGGA				947
Query 276	AGTTGCTTGTAAAGACGAAGTTGAGATCATCTGTGGTACTAATTTGTAGTAAGTGGGCATC				335
Sbjct 946	AGTTGCTTGTAAAGACGAAGTTGAGATCATCTGTGGTACTAATTTGTAGTAAGTGGGCATC				887
Query 336	TAAAGATAGGCAATTCTCCCGACTTTTTTCCAGTTAAAGGGCCCATGGAAGAGGTAACA				395
Sbjct 886	TAAAGATAGGCAATTCTCCCGACTTTTTTCCAGTTAAAGGGCCCATGGAAGAGGTAACA				827
Query 396	GTTTTCTTTATG 407				
Sbjct 826	GTTTTCTTTATG 815				

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Rattus norvegicus]

Sequence ID: [NP_579840.2](#) Length: 368 Number of Matches: 1

▶ [See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 246 to 368 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
	269 bits(688)	2e-87	Compositional matrix adjust.	123/123(100%)	123/123(100%)	0/123(0%)	-3
Query 407	HKENCYLFHGPFWNEKSRENCLSLDAQLLQISTDDLNFLVLAQTSHTSPFWMLHRKNP						228
Sbjct 246	HKENCYLFHGPFWNEKSRENCLSLDAQLLQISTDDLNFLVLAQTSHTSPFWMLHRKNP						305
Query 227	NHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKANLL						48
Sbjct 306	NHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKANLL						365
Query 47	LTQ 39						
Sbjct 366	LTQ 368						

Sekuen pcDNA3.1-LOX-1 dengan primer LOX-1 reverse

gcaGTTTTCCGCATAAAcAGCTCCTCGTTGTATATATGCACAGGTACCTGAAGGGTATGTCT
 GGGAGACAGCGCCTCGGACTCTAAATAAGTGGGCATCAAAGGAGAACCCTCCTCCAGAGC
 CATGGGTAGCTGGGGTTCCCTCCGAGACAGCCCCATCCAGAATGGAAAACCTGGAATAGGAAAT

```

TGCTTGCTGGATGAAGTCCAGATCAGCTGTGCTATTAATTTTCAGCAACTTGGCATCCAAAG
ACAAGCACTTCTCTTGGCTCTTTTCCCAGTTAAATGAGCCCAGGAAAATAGGTAACAGTTT
TCTCCATGCATGGCCATGGTGTAGCCAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTT
CGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGCTTATATAGACCTCC
CACCGTACACGCCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA
GTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAA
ATCCCGTGTAGTCAAACCGCTATCCACGCCATTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATG
GTAATAGCGATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCATAAGGTCATGTA
CTGGGCATAATGCCAGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCA
TATGATACTTGTATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAAnTACTCCACCATTGACGT
CAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCAATTATTGACGTCAATGGGCG
GGGTCGTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGCGGAACCTCCA
TATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAGTCAATAATCAA
TGTC AACGCGTATATCTGGCCCGTACATCGCGAAGCAGCGCAAAaCGCCTAACCCcTAAGCAG
ATTCTTCATGCAATTGTCGGTCAAGCCTTGCTTGTGTAGCTTAAaTTTtGCTcnnncACT
ACTCagcGAccTCca
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Rattus norvegicus oxidized low density lipoprotein receptor 1 (Olr1), mRNA

Sequence ID: [NM_133306.2](#) Length: 3751 Number of Matches: 1

Range 1: 814 to 1186 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	689 bits(373)	0.0	373/373(100%)	0/373(0%)	Plus/Plus
Query 7	GCATAAAGAAAAC	TGTTACCTCTTCCATGGGCCCTTTAACTGGGAAAAAAGTCGGGAGAA	66		
Sbjct 814	GCATAAAGAAAAC	TGTTACCTCTTCCATGGGCCCTTTAACTGGGAAAAAAGTCGGGAGAA	873		
Query 67	TTGCCTATCTTTAGATGCCCAAGT	TACTACAAAATTAGTACCACAGATGATCTGAACCTCGT	126		
Sbjct 874	TTGCCTATCTTTAGATGCCCAAGT	TACTACAAAATTAGTACCACAGATGATCTGAACCTCGT	933		
Query 127	CTTACAAGCAACTTCCCATCCACCT	CCCCATTTGGATGGGATTACATCGGAAAAATCC	186		
Sbjct 934	CTTACAAGCAACTTCCCATCCACCT	CCCCATTTGGATGGGATTACATCGGAAAAATCC	993		
Query 187	CAACCACCCATGGCTATGGGAGAAC	CGGCTCTCCTTTGAGTTTTCAATTCTTTAGGACCAG	246		
Sbjct 994	CAACCACCCATGGCTATGGGAGAAC	CGGCTCTCCTTTGAGTTTTCAATTCTTTAGGACCAG	1053		
Query 247	GGGCGTTTCTTTACAGATGTA	CTCATCAGGCACCTGTGCATATATTCAAGGAGGAGTTGT	306		
Sbjct 1054	GGGCGTTTCTTTACAGATGTA	CTCATCAGGCACCTGTGCATATATTCAAGGAGGAGTTGT	1113		
Query 307	GTTTGCTGAAAAC	TGCAATTTAACTGCATTGAGCATATGTCAGAAGAAGGCAAAATTTATT	366		
Sbjct 1114	GTTTGCTGAAAAC	TGCAATTTAACTGCATTGAGCATATGTCAGAAGAAGGCAAAATTTATT	1173		
Query 367	GCTAACTCAGTGA	379			
Sbjct 1174	GCTAACTCAGTGA	1186			

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Rattus norvegicus]

Sequence ID: [NP_579840.2](#) Length: 368 Number of Matches: 1

[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 246 to 368 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
268 bits(686)	1e-86	Compositional matrix adjust.	123/123(100%)	123/123(100%)	0/123(0%)	+2
Query 8		HKENCYLFHGGPFNWEKSRENCLSLDAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNP		187		
Sbjct 246		HKENCYLFHGGPFNWEKSRENCLSLDAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNP		305		
Query 188		NHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKANLL		367		
Sbjct 306		NHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKANLL		365		
Query 368	LTQ 376					
Sbjct 366	LTQ 368					



Lampiran 5

Hasil Uji Normalitas Data Ekspresi eNOS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		eNOS
N		15
	Mean	271018.65
	Std. Deviation	6
Normal Parameters(a,b)		52202.190
		3
Most Extreme Differences	Absolute	.138
	Positive	.104
	Negative	-.138
Kolmogorov-Smirnov Z		.534
Asymp. Sig. (2-tailed)		.938

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Hasil Uji Beda Ekspresi eNOS dengan One-way ANOVA

**ANOVA
eNOS**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	614.730	5	122.946	1.126	.419
Within Groups	873.835	8	109.229		
Total	1488.566	13			



Lampiran 6

Hasil Uji Normalitas Data Ekspresi LOX-1

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	LOX1
N	16
Mean	273961.813
Std. Deviation	51787.7501
Absolute	.141
Positive	.102
Negative	-.141
Kolmogorov-Smirnov Z	.562
Asymp. Sig. (2-tailed)	.910

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Hasil Uji Beda Ekspresi LOX-1

ANOVA

LOX1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15178257586.354	5	3035651517.271	1.212	.371
Within Groups	25051308298.083	10	2505130829.808		
Total	40229565884.437	15			



Lampiran 7

Hasil Uji Normalitas Data Jumlah Sel Busa

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SelBusa
N		17
Normal Parameters(a,b)	Mean	34.588
	Std. Deviation	21.8519
	Most Extreme Differences	
	Absolute	.158
	Positive	.158
	Negative	-.095
Kolmogorov-Smirnov Z		.651
Asymp. Sig. (2-tailed)		.791

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Hasil Uji Beda Data Jumlah Sel Busa

ANOVA

SelBusa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3857.947	5	771.589	2.381	.096
Within Groups	4213.000	13	324.077		
Total	8070.947	18			



Lampiran 8

Persetujuan laik Etik untuk Penelitian Tahap II dengan Hewan Coba



平成29年11月9日

医学部長 殿

信州大学長
濱田 州博 (公印省略)

動物実験計画の変更承認について

下記のとおり申請のありました動物実験計画の変更を承認します。

記

動物実験責任者名

医学部 教授 沢村 達也

研究課題名

LOX-1 に対する DNA ワクチンの検討

承認番号

No. 290036

承認期間

平成29年11月9日 ~ 平成30年3月31日

備考





Persetujuan laik Etik untuk Penelitian Tahap II dengan Hewan Coba

Shinshu University

Shinshu University School of Medicine

September, 9th 2018

Dean of School of Medicine

Shinshu University President

Kunihiro Hamada

On the Approval of Animal Experiment Plan Change

Approving the change on animal experiment in application below

Record:

Person in Charge of Animal Experiment:

School of Medicine Professor Tatsuya Sawamura

Research Subject:

A Study on DNA Vaccine towards LOX-1

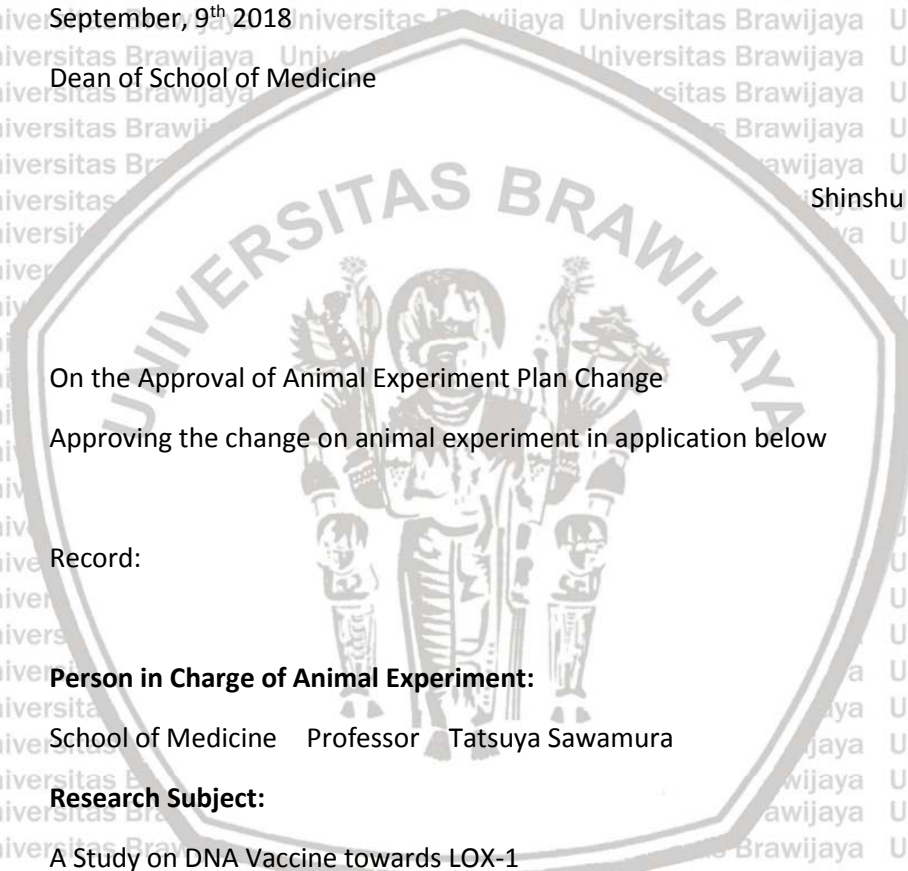
Approval Number:

No. 290036

Approval Period:

November, 9th 2018 – March, 31st 2019

Note:



Persetujuan Laik Etik untuk Penelitian Tahap II dengan DNA Rekombinan



平成29年11月24日

医学部長 殿

信州大学長
濱田 州博 (公印省略)

遺伝子組換え実験計画の変更承認について (通知)

下記のとおり申請のありました遺伝子組換え実験計画の変更を承認します。
拡散防止措置等の詳細は、各研究室に配布してある資料をご参照ください。

記

実験責任者名

医学部 教授 沢村 達也

研究課題名

乳酸菌発現系を利用した、LOX-1 に対する DNA ワクチンの検討

拡散防止措置のレベル

P1, P1A

承認番号

No.17-076

実験実施期間

平成 29 年 11 月 24 日～平成 33 年 3 月 31 日

備考



Persetujuan Laik Etik untuk Penelitian tahap II dengan DNA Rekombinan

Shinshu University

Shinshu University School of Medicine

November, 24th 2018

Dean of School of Medicine

Shinshu University President

Kunihiro Hamada

(Notice) on the approval of genetic change experiment plan change

Approving genetic change experiment change of plan in the application below:

Details on diffusion prevention measures please refer to the data distributed in laboratory

Record

Person in Charge of Animal Experiment:

School of Medicine Professor Tatsuya Sawamura

Research Subject:

A Study on DNA Vaccine towards LOX-1 using lactococcus expression system

Diffusion Prevention Measure Level:

P1, P1A

Approval Number:

No.17-076

Experiment Implementation Period:

September, 24th 2018 – March, 31st 2022

Note:

Lampiran 9

Hasil Sekuensing pNZGFP-LOX-1, pNZGFP, pNZLOX-1

Sekuen pNZ8148 GFP- LOX-1 dengan primer pNZ8148 forward

```

GNCCNNNNNNNGGNNNCNCTGCCNTGGAAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATC
TGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGAAGGCCTTATAATGGAAGTGGATCCGCATGCGAGCTCG
GTACCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGAC
GGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGG
CAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCG
TGACCACCCTGGCCTACGGCGTGCAGTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAC
GACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCA
TCGAGCTGAAGGGCACCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTAC
AACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA
CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGA
ACACCCCATCGGGCAGGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCC
GCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGC
CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGNCGAGCTGTACAAGGGATCCATAAAGAAAACCTGTTACC
CTCTTCCATGGNNCCNTTTAACTGGGAAAAANNCGGGNNNNNNNCNNTCNTTANANNCCNN
NTTACTANNAANNTNNANNNNNNN
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Synthetic construct EGFP gene, complete sequence, Clone_id: SNGD_293T_biEGFPcC>G_006
 Sequence ID: [LC336974.1](#) Length: 721 Number of Matches: 1

Range 1: 5 to 718		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1304 bits(706)	0.0	711/714(99%)	0/714(0%)	Plus/Plus	
Query 1	60	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTCCCATCTCTGGTTCGAGCTGGACGGC			
Sbjct 5	64	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTCCCATCTCTGGTTCGAGCTGGACGGC			
Query 61	120	GACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGC			
Sbjct 65	124	GACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGC			
Query 121	180	AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCG			
Sbjct 125	184	AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCG			
Query 181	240	GTGACACCCCTGGCCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCAACATGAAGCAG			
Sbjct 185	244	GTGACACCCCTGGCCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCAACATGAAGCAG			
Query 241	300	CACGACTTCTTCAAGTCCGGCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC			
Sbjct 245	304	CACGACTTCTTCAAGTCCGGCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC			
Query 301	360	AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTG			
Sbjct 305	364	AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTG			
Query 361	420	AACCGCATCGAGCTGAAGGGCACGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGACAAG			
Sbjct 365	424	AACCGCATCGAGCTGAAGGGCACGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGACAAG			
Query 421	480	CTGGAGTACAACACAACAGCCACAAGCTATATCATGCCGACAAGCAGAAGAAGCGC			
Sbjct 425	484	CTGGAGTACAACACAACAGCCACAAGCTATATCATGCCGACAAGCAGAAGAAGCGC			
Query 481	540	ATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCGCAACACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC			
Sbjct 485	544	ATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCGCAACACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC			
Query 541	600	CACTACCAAGCAGAAGACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTAC			
Sbjct 545	604	CACTACCAAGCAGAAGACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTAC			
Query 601	660	CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAAGCAGAAGCGCGATCACATGGTCTCG			
Sbjct 605	664	CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAAGCAGAAGCGCGATCACATGGTCTCG			
Query 661	714	CTGGAGTTCGTGACCCGCGCCGGGATCACTCTCGGATGCGAGTGTACAAG			
Sbjct 665	718	CTGGAGTTCGTGACCCGCGCCGGGATCACTCTCGGATGCGAGTGTACAAG			

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

enhanced green fluorescent protein [synthetic construct]

Sequence ID: [ADQ48006.1](#) Length: 268 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 239 [GenPept](#) [Graphics](#)

Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame																																												
490 bits(1261)	1e-174	Compositional matrix adjust.	235/238(99%)	235/238(98%)	0/238(0%)	+1																																												
Query 1	VSKGEELFTGWVPI	LV	LDG	DV	NGHK	FV	SV	SG	EG	EG	DAT	YG	KL	TK	LK	FI	CT	TG	KL	PV	PM	PTL	180																											
Sbjct 2	VSKGEELFTGWVPI	LV	LDG	DV	NGHK	FV	SV	SG	EG	EG	DAT	YG	KL	TK	LK	FI	CT	TG	KL	PV	PM	PTL	61																											
Query 181	VTTLAYGVQCF	SR	YP	DH	MK	QH	DF	FK	SAM	PE	GY	VQ	ERT	I	FF	KD	DD	GN	YK	TR	AE	VK	FE	GD	TLV	360																								
Sbjct 62	VTTLYGVQCF	SR	YP	DH	MK	QH	DF	FK	SAM	PE	GY	VQ	ERT	I	FF	KD	DD	GN	YK	TR	AE	VK	FE	GD	TLV	121																								
Query 361	NRIELKGTDF	K	ED	GN	IL	G	H	K	L	E	Y	N	S	H	N	V	I	M	A	D	K	Q	K	N	G	I	K	V	N	F	K	I	R	H	N	I	E	D	G	S	V	Q	L	A	D	540				
Sbjct 122	NRIELKGTDF	K	ED	GN	IL	G	H	K	L	E	Y	N	S	H	N	V	I	M	A	D	K	Q	K	N	G	I	K	V	N	F	K	I	R	H	N	I	E	D	G	S	V	Q	L	A	D	181				
Query 541	HYQONTPI	D	G	P	V	L	L	P	D	N	H	L	S	T	Q	S	A	L	S	K	D	P	N	E	K	R	D	H	M	V	L	L	E	F	V	T	A	A	G	I	T	L	G	M	X	E	L	Y	K	714
Sbjct 182	HYQONTPI	D	G	P	V	L	L	P	D	N	H	L	S	T	Q	S	A	L	S	K	D	P	N	E	K	R	D	H	M	V	L	L	E	F	V	T	A	A	G	I	T	L	G	M	X	E	L	Y	K	239

Sekuen pNZ8148 GFP- LOX-1 dengan primer pNZ8148 reverse

```

NNNCCNNNNNNNNNNNCAANCAACNCGTGCTGTAATTTGTTTAATTGCCATTTCAATTGAAC
GTTTCAAGCCTTGGTTTTTCNAAATTTGGTTCAAAGAAAGCTTGCTGAGTAAGCAATAAATTT
GCCTTCTTCTGACATATGCTGAATGCAGTTAAATGCAGTTTTTCAGCAAACACAACCTCCTCC
TTGAATATATGCACAGGTGCCTGATGAGTACATCTGTAAAGAAACGCCCTGGTCCTAAAGA
ATTGAAAACCTCAAAGGAGAGCCGTTCTCCATAGCCATGGGTGGTGGGATTTTTCCGATGT
AATCCCATCCAAAATGGGGAGGTGGAATGGGAAGTTGCTTGTAAAGACGAAGTTCAGATCATC
TGTGGTACTAATTTGTAGTAACTGGGCATCTAAAGATAGGCAATTCCTCCGACTTTTTTCCC
AGTTAAAGGGCCCATGGAAGAGGTAACAGTTTTCTTTATGGGATCCCTTGTACAGCTCGTCC
ATGCCGAGAGTGATCCCGCGCGGGTCACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTC
GTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCCGGCAGCAGCACGG
GGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCCGGCAGCTGCACGCTGCCGTCCCTCG
ATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCCGCCATGATATA
GACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCTCCTTGA
AGTCGGTGCCTTTTCAGCTCGATGCGGGTNCACCAGGGTGTCCGCCCTCGAAACTTCACCTTC
NGCGCGGGTCTTGNAGTTGCCCGTCNTCCNTTNNNNAAGAANGNNNGCGNNNCNGGAACNNN
CCCTTCNNNGGCNNNGGCGNNGNANNNTNNNN
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Rattus norvegicus oxidized low density lipoprotein receptor 1 (Olr1), mRNA
 Sequence ID: [NM_133306.2](#) Length: 3751 Number of Matches: 1

Range 1: 815 to 1183 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	676 bits(366)	0.0	368/369(99%)	0/369(0%)	Plus/Minus
Query 79	CTGAGTAAGCAATAAATTTGCCTTCTTCTGACATATGCTGAATGCAGTTAAAATGCAGTT				138
Sbjct 1183	CTGAGTTAGCAATAAATTTGCCTTCTTCTGACATATGCTGAATGCAGTTAAAATGCAGTT				1124
Query 139	TT CAGCAAACACAACCTCTCCTTGAATATATGCACAGGTGCCTGATGAGTACATCTGTAA				198
Sbjct 1123	TT CAGCAAACACAACCTCTCCTTGAATATATGCACAGGTGCCTGATGAGTACATCTGTAA				1064
Query 199	AGAAACGCCCTGGTCTCAAAGAAATGAAAACCTCAAAGGAGAGCCGTTCTCCCATAGCCA				258
Sbjct 1063	AGAAACGCCCTGGTCTCAAAGAAATGAAAACCTCAAAGGAGAGCCGTTCTCCCATAGCCA				1004
Query 259	TGGGTGGTTGGGATTTTTCCGATGTAATCCCATCCAAAATGGGGAGGTGGAATGGGAAGT				318
Sbjct 1003	TGGGTGGTTGGGATTTTTCCGATGTAATCCCATCCAAAATGGGGAGGTGGAATGGGAAGT				944
Query 319	TGCTTGAAGACGAAGTTCAGATCATCTGTGGTACTAATTTGTAGTAACTGGGCATCTAA				378
Sbjct 943	TGCTTGAAGACGAAGTTCAGATCATCTGTGGTACTAATTTGTAGTAACTGGGCATCTAA				884
Query 379	AGATAGGCAATTCTCCCGACTTTTTTCCCAGTTAAAGGGCCCATGGAAGAGGTAACAGTT				438
Sbjct 883	AGATAGGCAATTCTCCCGACTTTTTTCCCAGTTAAAGGGCCCATGGAAGAGGTAACAGTT				824
Query 439	TTCTTTATG 447				
Sbjct 823	TTCTTTATG 815				

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Rattus norvegicus]

Sequence ID: [NP_579840.2](#) Length: 368 Number of Matches: 1

▶ [See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 246 to 368 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
	273 bits(697)	4e-87	Compositional matrix adjust.	123/123(100%)	123/123(100%)	0/123(0%)	-1
Query 447	HKENCYLFHGFNWEKSRENCLSLDAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNP						268
Sbjct 246	HKENCYLFHGFNWEKSRENCLSLDAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNP						305
Query 267	NHPWLWENGSPFSFQFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKNLL						88
Sbjct 306	NHPWLWENGSPFSFQFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKNLL						365
Query 87	LTQ 79						
Sbjct 366	LTQ 368						

Sekuen pNZ8148 LOX-1 dengan primer pNZ8148 forward

NNNGNNNNNNNNNNNNNNNTCNCTGCCNTGNNGAGGATCGCANTCACCATCACCATCACGG
 ATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGNAGGCCTTATAATGGAACCTGGATCCCATAAAGAAA
 ACTGTTACCTCTTCCATGGGCCCTTTAACTGGGAAAAAAGTCGGGAGAATTGCCTATCTTTG
 ATGCCAGTTACTACAAATTAGTACCACAGATGATCTGAACTTCGTCTTACAAGCAACTTCC

CATTCCACCTCCCCATTTTGGATGGGATTACATCGGAAAAATCCCAACCACCATGGCTATGG
 GAGAACGGCTCTCCTTTGAGTTTTCAATTCCTTAGGACCAGGGCGTTTTCTTTACAGATGTA
 CTCATCAGGCACCTGTGCATATATCAAGGAGGAGTTGTGTTTGCTGAAAACCTGCATTTTAA
 CTGCATTCAGCATATGTCAGAAGAAGGCAAATTTATGCTTACTCAGCAAGCTTTCCTTGAA
 CAAAAATTAGAAAACCAAGGCTTGAAACGTTCAATTGAAATGGCAATTAACAAAATTACAGC
 ACGTGTGCTTTGATTGATAGCCAAAAAGCAGCAGTTGATAAAGCAATTAAGTATTTGCTG
 AAAAAATGTAATTTATAAAATAAAAAATCACCTTTTAGAGGTGGTTTTTTTATTTATAAATTA
 TTCGTTTGATTTGCTTCGATAGAACAATCAAATCGTTTCTGAGACGTTTTAGCGTTTTATTT
 CGTTTAGTTATCGGCATNATCGGTNAAACAGGCGTATCGTAGCGTAAAAGCCCNTGAGCGTA
 GCGTGNTTTCAGCNAAGATGTTGNCTGNTNNTGAAAGCCGANNNACTAAATGAANNAN
 NAGCGCAGCGTCCNTTCNNNTTNNNNNNNNNGNNGNNTCNNGGNNNNNNNNNNNGNNNNNNNAAA
 NNNNCCCTNNNNNGNNGNN

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Rattus norvegicus oxidized low density lipoprotein receptor 1 (Olr1), mRNA
 Sequence ID: [NM_133306.2](#) Length: 3751 Number of Matches: 1

Range 1: 804 to 1183 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
665 bits(360)	0.0	374/380(98%)	4/380(1%)	Plus/Plus
Query 84	ACTGGATC--CCATAAAGAAAAC	TGTTACCTCTTCCATGGGCCCTTTAACTGGGAAAAAA		141
Sbjct 804	ACTGGATCTGGCATAAAGAAAAC	TGTTACCTCTTCCATGGGCCCTTTAACTGGGAAAAAA		863
Query 142	GTCGGGAGAATTGCCTATCTTT	-GATGCCCAGTTACTACAAATTAGTACCACAGATGATC		200
Sbjct 864	GTCGGGAGAATTGCCTATCTTT	AGATGCCCAGTTACTACAAATTAGTACCACAGATGATC		923
Query 201	TGAACCTCGTCTTACAAGCAACT	CCCCATCCACCTCCCCATTTGGATGGGATTACATC		260
Sbjct 924	TGAACCTCGTCTTACAAGCAACT	CCCCATCCACCTCCCCATTTGGATGGGATTACATC		983
Query 261	GGAAAAATCCCAACCA-CCATGGCT	ATGGGAGAACGGCTCTCCTTTGAGTTTTCAATTCT		319
Sbjct 984	GGAAAAATCCCAACCA-CCATGGCT	ATGGGAGAACGGCTCTCCTTTGAGTTTTCAATTCT		1043
Query 320	TTAGGACCAGGGGCGTTTCTTT	TACAGATGACTCATCAGGCACCTGTGCATATATTCAAG		379
Sbjct 1044	TTAGGACCAGGGGCGTTTCTTT	TACAGATGACTCATCAGGCACCTGTGCATATATTCAAG		1103
Query 380	GAGGAGTTGTGTTTGCTGAAAAC	TGCATTTAACTGCATTCAGCATATGTCAGAAGAAGG		439
Sbjct 1104	GAGGAGTTGTGTTTGCTGAAAAC	TGCATTTAACTGCATTCAGCATATGTCAGAAGAAGG		1163
Query 440	CAAATTTATTGCTTACTCAG			459
Sbjct 1164	CAAATTTATTGCTTACTCAG			1183

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Rattus norvegicus]

Sequence ID: [NP_579840.2](#) Length: 368 Number of Matches: 2

[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 295 to 368 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
137 bits(345)	3e-34	Compositional matrix adjust.	63/74(85%)	65/74(87%)	0/74(0%)	+1

Query 238 PILDGITSEKSPPIWLENGSPLSFQFFRTRGVLSQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTA 417
 P G+ + PWLENGSPLSFQFFRTRGVLSQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTA
 Sbjct 295 PFWMGLHRKNPNHPWLENGSPLSFQFFRTRGVLSQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTA 354

Query 418 FSICQKKANLLLTQ 459
 FSICQKKANLLLTQ
 Sbjct 355 FSICQKKANLLLTQ 368

Range 2: 269 to 307 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
84.7 bits(208)	6e-15	Compositional matrix adjust.	38/39(97%)	38/39(97%)	0/39(0%)	+2

Query 161 FDAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNPNH 277
 DAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNPNH
 Sbjct 269 LDAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNPNH 307

Sekuen pNZ8148 LOX-1 dengan primer pNZ8148 reverse

CNNNNNNNNNNNNNAANCANCNCGTGCTGTAATTTGTTTAATTGCCATTTCAATTGAACG
 TTTCAAGCCTTGGTTTTCNAATTTTGGTTCAAAGAAAGCTTGCTGAGTAAGCAATAAATTTG
 CCTTCTTCTGACATATGCTGAATGCAGTTAAAATGCAGTTTTTCAGCAAACACAACCTCCTCT
 TGAATATATGCACAGGTGCCTGATGAGTACATCTGTAAAGAAACGCCCTGGTCTAAAGAA
 TTGAAAACCTCAAAGGAGAGCCGTTCTCCCATAGCCATGGGTGGTGGGATTTTTCCGATGTA
 ATCCCATCCAAAATGGGGAGGTGGAATGGGAAGTTGCTTGTAAAGACGAAGTTCAGATCATCT
 GTGGTACTAATTTGTAGTAACTGGGCATCTAAAGATAGGCAATTCCTCCGACTTTTTTCCCA
 GTTAAAGGGCCCATGGAAGAGGTAACAGTTTTCTTTATGGGATCCAGTTCATTATAAGGCC
 TTCCCTCGATAACCAGATCCAGAGCCAGATCCGTGATGGTATGCGATCCTCTTTCCA
 TGGCAGCGTAAACACCTGACAACGGGGCTGCAGCAGAAAGTATCACTGTAGACATTAATA
 GCTGAGATAATCTTTTTTTTTCATGGTGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTCCTTCG
 AACGAAATCATTGTATCTAACAACTTCAGAATTTAATCAGAGCCGTTTATTATGCTCGCGT
 TATCGACAATAATATTATTACCAATACTTTCTCAAGATAGAATTAAGACTGTTTTAGATTTG
 TTAATGTTTCTATTGTGAGTATAGTTATAAGACTAGATCTGGGAGCTGTAAANATAAAAACCC
 TTCTTCAACTAACGGGGNNGGTTTANNGAACANTNNNAAANNACNGNNAAAAAGNAANN
 NNNGNNTTTATTCTTNCANNAANTTATANNNAAAAANNNNN

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Rattus norvegicus oxidized low density lipoprotein receptor 1 (Olr1), mRNA

Sequence ID: [NM_133306.2](#) Length: 3751 Number of Matches: 1

Range 1: 804 to 1183 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	678 bits(367)	0.0	376/380(99%)	2/380(0%)	Plus/Minus
Query 81	CTGAGTAAGCAATAAATTTGCCTTCTTCTGACATATGCTGAATGCAGTTAAAAATGCAGTT				140
Sbjct 1183	CTGAGTTAGCAATAAATTTGCCTTCTTCTGACATATGCTGAATGCAGTTAAAAATGCAGTT				1124
Query 141	TTGAGCAAAACACAACCTCCTTGAATATATGCACAGGTGCCTGATGAGTACATCTGTAA				200
Sbjct 1123	TTGAGCAAAACACAACCTCCTTGAATATATGCACAGGTGCCTGATGAGTACATCTGTAA				1064
Query 201	AGAAACGCCCTGGTCTTAAAGAATTGAAAACCAAAGGAGAGCCGTTCTCCCATAGCCA				260
Sbjct 1063	AGAAACGCCCTGGTCTTAAAGAATTGAAAACCAAAGGAGAGCCGTTCTCCCATAGCCA				1004
Query 261	TGGGTGGTTGGGATTTTTCCGATGTAATCCCATCCAAAATGGGAGGTTGGAATGGGAAGT				320
Sbjct 1003	TGGGTGGTTGGGATTTTTCCGATGTAATCCCATCCAAAATGGGAGGTTGGAATGGGAAGT				944
Query 321	TGCTTGAAGACGAAGTTCAGATCATCTGTGGTACTAATTTGTAGTAACTGGGCATCTAA				380
Sbjct 943	TGCTTGAAGACGAAGTTCAGATCATCTGTGGTACTAATTTGTAGTAACTGGGCATCTAA				884
Query 381	AGATAGGCAATTCTCCCGACTTTTTTCCAGTTAAAGGGCCCATGGGAAGGTTAACAGTT				440
Sbjct 883	AGATAGGCAATTCTCCCGACTTTTTTCCAGTTAAAGGGCCCATGGGAAGGTTAACAGTT				824
Query 441	TTCTTTATGG--GATCCAGT 458				
Sbjct 823	TTCTTTATGCCAGATCCAGT 804				

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Rattus norvegicus]

Sequence ID: [NP_579840.2](#) Length: 368 Number of Matches: 1

▶ See 1 more title(s)

Range 1: 246 to 368 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
	269 bits(688)	2e-85	Compositional matrix adjust.	123/123(100%)	123/123(100%)	0/123(0%)	-1
Query 449	HKENCYLFHGFNWEKSRENCLSLDAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNP						270
Sbjct 246	HKENCYLFHGFNWEKSRENCLSLDAQLLQISTTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNP						305
Query 269	NHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAIYQGGVFAENCILTAFSICQKKNALL						90
Sbjct 306	NHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAIYQGGVFAENCILTAFSICQKKNALL						365
Query 89	LTQ 81						
Sbjct 366	LTQ 368						

Sekuen pcNZ8148 GFP dengan primer pNZ8148 forward

```

NNNCNNNNNNNNNNNNNNNNCTGCCNTGNNAGAGGATCGCATCACCATCAACCATCACGGAT
CTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGNAGGCCTTATAATGGAAGTGGATCCGCATGCGAGCTC
GGTACCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTGGGCTGGA
CGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG
GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTC
GTGACCACCCTGACCTAGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCA
CGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGG
ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC
    
```

```

ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTA
CAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA
ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG
AACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC
CGCCCTGAGCAAAGANCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCG
CCGCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGACGTGTACAAGCAAGCTTTCTTTGAACNAAATTA
NAAAACNNAAGGNTTGAAAACGTTCAATTTGGAANNNGNNANTAAACCAAANNACAGCNNCN
NNNNNNNTTTNANNTNGNANTNNGCCCCANNNN
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Synthetic construct EGFP gene, complete sequence, Clone_id: SNGD_293T_biEGFPc>G_006
 Sequence ID: [LC336974.1](#) Length: 721 Number of Matches: 1

Range 1: 5 to 663 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1203 bits(651)	0.0	656/659(99%)	0/659(0%)	Plus/Plus
Query 100	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCATCCTGGTGGGCTGGACGGC	159			
Sbjct 5	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCATCCTGGTGGGCTGGACGGC	64			
Query 160	GACGTAACCGGCCACAAGTTCAAGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGC	219			
Sbjct 65	GACGTAACCGGCCACAAGTTCAAGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGC	124			
Query 220	AAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTC	279			
Sbjct 125	AAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTC	184			
Query 280	GTGACCACCTGACCTAGGGCGTGCAGTGCTTCAAGCGCTACCCCGACCATGAAGCAG	339			
Sbjct 185	GTGACCACCTGACCTAGGGCGTGCAGTGCTTCAAGCGCTACCCCGACCATGAAGCAG	244			
Query 340	CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC	399			
Sbjct 245	CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC	304			
Query 400	AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTG	459			
Sbjct 305	AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTG	364			
Query 460	AACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG	519			
Sbjct 365	AACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG	424			
Query 520	CTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC	579			
Sbjct 425	CTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC	484			
Query 580	ATCAAGGTGAACCTTCAAGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC	639			
Sbjct 485	ATCAAGGTGAACCTTCAAGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC	544			
Query 640	CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCCCGACAACCACTAC	699			
Sbjct 545	CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCCCGACAACCACTAC	604			
Query 700	CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGANCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCT	758			
Sbjct 605	CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGANCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCT	663			

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

enhanced green fluorescent protein [synthetic construct]

Sequence ID: [ADQ48006.1](#) Length: 268 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 220 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
411 bits(1056)	2e-143	Compositional matrix adjust.	216/219(99%)	216/219(98%)	0/219(0%)	+1
Query 100	VSKGEELFTGVVPIVLVGLDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFICTTGKLPVWPPTL			279		
Sbjct 2	VSKGEELFTGVVPILV LDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFICTTGKLPVWPPTL			61		
Query 280	vttlt*gvQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD TLV			459		
Sbjct 62	VTTLT GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD TLV			121		
Query 460	NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD			639		
Sbjct 122	NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD			181		
Query 640	HYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSXPNEKRDPHMV		756			
Sbjct 182	HYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSXPNEKRDPHMV		220			

Sekuen pcNZ8148 GFP dengan primer pNZ8148 reverse

```
CCNNNNNNNNNTNNNCAAANNANCNCGTGCTGTAATTTGTTTAAATTGCCATTTCAATTGAAC
GTTTCAAGCCTTGGTTTTCNAAATTTGGTTCAAAGAAAGCTTGCTTGTACACGTCGTCATG
CCGAGAGTGATCCCGGCGGGCGGTACGAAC TCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTT
GGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGC
CGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCAGCTGCACGCTGCCGTCTCGATG
TTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCCGCCATGATATAGAC
GTTGTGGCTGTTGTAGTTGTA CTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCTCTCCTTGAAGT
CGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACCAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACCTCGGC GCGG
GTCTTGTAGTTGCCGTGCTCCTTGAAGAAGATGGTGGCCTCCTGGCGTAGCCTTCGGGCATG
GCGGACTTGAAGAAGTCTGCTGCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCC
CTAGGTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGA
ACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAAC TTG
TGGCCGTTTACGTCGCCGTCCAGCCCACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTC
GCCCTTGCTCACGGTACCGAGCTCGCATGCGGATCCAGTTTCCATTATAAGGGCCTTCCCTC
GATACCAGGATCCAGAGCCAGATCCGNGANNNGNATNGNNATGCCGANNCCNNTTTCCAN
TNNNAGNCNNNNAAANNCCNNNNNNAANCNGGGGGGG
```



Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Synthetic construct clone pKS15-01-EGFP polyprotein/EGFP fusion gene, complete cds
Sequence ID: [KX349734.1](#) Length: 8053 Number of Matches: 1

Range 1: 3711 to 4230 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
937 bits(507)	0.0	516/520(99%)	1/520(0%)	Plus/Minus

Query	76	CTTGCTTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCC	GGCGGGCGGT	CACGA	ACTCCAGCA	135
Sbjct	4230	CTTCCTTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCC	GGCGGGCGGT	CACGA	ACTCCAGCA	4171
Query	136	GGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCT	CAGGGCGGACT	GGGTGCT	CAGGT	195
Sbjct	4170	GGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCT	CAGGGCGGACT	GGGTGCT	CAGGT	4111
Query	196	AGTGGTTGTGGGCGAGCAGCACGGGGCCGTCCGGCAT	GGGGGTGTTCT	GCTG	GTAAGTGGT	255
Sbjct	4110	AGTGGTTGTGGGCGAGCAGCACGGGGCCGTCCGGCAT	GGGGGTGTTCT	GCTG	GTAAGTGGT	4051
Query	256	CGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGGCGG	ATCTTGAAGT	TTCACCT	TGATGC	315
Sbjct	4050	CGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGGCGG	ATCTTGAAGT	TTCACCT	TGATGC	3991
Query	316	CGTTCCTTCTGCTTGTGGCCATGATATAGACGTTGT	GGCTGTGTAGT	TGTA	CTCCAGCT	375
Sbjct	3990	CGTTCCTTCTGCTTGTGGCCATGATATAGACGTTGT	GGCTGTGTAGT	TGTA	CTCCAGCT	3931
Query	376	TGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGT	GATGCCCTT	CAGCT	CGATGCGGTTCA	435
Sbjct	3930	TGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGT	GATGCCCTT	CAGCT	CGATGCGGTTCA	3871
Query	436	CCAGGGTGTGCCCTCGAAGTTCACCTCGGCGGGGCT	TGTAGT	TGCCGTC	GCTCCTTGA	495
Sbjct	3870	CCAGGGTGTGCCCTCGAAGTTCACCTCGGCGGGGCT	TGTAGT	TGCCGTC	GCTCCTTGA	3811
Query	496	AGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTGGGCAT	GGCGGACTT	GAAAG	AAGTCGTGCT	554
Sbjct	3810	AGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTGGGCAT	GGCGGACTT	GAAAG	AAGTCGTGCT	3751
Query	555	GCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCAC	GCC	594		
Sbjct	3750	GCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCAC	GCC	3711		

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

enhanced green fluorescent protein [synthetic construct]

Sequence ID: [ADQ48006.1](#) Length: 268 Number of Matches: 2

Range 1: 95 to 242 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
300 bits(768)	2e-100	Compositional matrix adjust.	143/148(97%)	145/148(97%)	0/148(0%)	-3

Query	514	QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI	DFKEDGNILGHKLE	YNYNSHNVYIM	335	
Sbjct	95	QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI	DFKEDGNILGHKLE	YNYNSHNVYIM	154	
Query	334	ADKQKNGIKVNFKIRHNI	EDGVSQVLAADHYQ	QNTPIGDGPVLLPDN	HYLSTQSALS	KDPNE 155
Sbjct	155	ADKQKNGIKVNFKIRHNI	EDGVSQVLAADHYQ	QNTPIGDGPVLLPDN	HYLSTQSALS	KDPNE 214
Query	154	KRDHMVLL	EFVTAAGITLGMDDVYKQAF	71		
Sbjct	215	KRDHMVLL	EFVTAAGITLGMDDVYKQAF	71		
			KRDHMVLL	EFVTAAGITLGMDELYKSG	242	

Range 2: 68 to 93 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
62.8 bits(151)	3e-08	Compositional matrix adjust.	26/26(100%)	26/26(100%)	0/26(0%)	-1

Query	594	GVQCF	SRYPDHMKQHDFFKSAMPEGY	517
Sbjct	68	GVQCF	SRYPDHMKQHDFFKSAMPEGY	93



Lampiran 10

Hasil Sekuensing pNZGFP-LOX-1, pNZGFP, pNZLOX-1 dengan optimasi kodon

Sekuen pcNZ8148 GFP- LOX-1 dengan primer pNZ8148 forward

```

GGATCCGTTTCAAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGAGTAGTTCCTATATTAGTGGAACCTTGA
TGGTGATGTTAATGGGCATAAATTTTCAGTGTCTGGAGAAGGAGAAGGTGATGCAACGTATG
GAAAATTGACCCTTAAATTTATCTGTACAACCTGGCAAATTACCAGTACCTTGGCCAACCTTA
GTCACTACTTTGACATATGGTGTCCAGTGTTTTAGTCGTTATCCAGACCATATGAAACAACA
CGATTTCTTTAAATCAGCCATGCCTGAAGTTATGTACAAGAACGAACGATTTTCTTTAAGG
ACGATGGTAATTACAAAACAAGAGCCGAAGTAAAAATTTGAAGGAGATACATTGGTTAATCGA
ATAGAACTTAAAGGCATTGATTTTAAAGAAGATGGCAACATTTTAGGCCATAAATTTGGAATA
CAACTATAATTCTCATAATGTTTATATTATGGCAGACAAACAAAAGAATGGGATCAAAGTGA
ACTTTAAAATTCGTCATAATATTGAGGATGGAAGCGTACAACCTAGCTGACCACCTATCAACAA
AACACGCCAATTGGTGATGGACCTGTTCTTTTACCTGATAATCACTATTTAAGCACTCAAAG
TGCTTTAAGCAAAGATCCAAATGAGAAACGCGATCACATGGTGTATTAGAGTTCGTTACAG
CTGCAGGGATTACCTTGGGAATGGATGAACTATATAAGGGTACCCATAAAGAGAATTGTTAC
TTATTTTCATGGTCCGTTTAACTGGGAAAAGTCAAGAGAAAATTGCTTAAGTTTAGATGCTCA
ACTTCTTCAAATCAGTACCCTGATGACTTAAATTTTGTCTTACAAGCTACATCTCATTCAA
CATCACCGTTTTGGATGGGACTACATAGAAAGAATCCCAATCATCCATGGTTATGGGAAAAT
GGATCTCCACTATCATTTTCAGTTCTTTCGTAAGTAGAGGAGTTTCATTGCAGATGTATTCATC
TGGTACATGTGCGTATATAACAAGGAGGGTTGTCTTTGCAGAGAATTGCATTTTACTGCGAT
TTTCAATTTGTCAGAAGAAGCGAATCTTCTTTTAAACACAATAAAAAGCT
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Synthetic construct hgfp gene for green fluorescent protein, complete cds
 Sequence ID: LC018335.1 Length: 717 Number of Matches: 1

Range 1: 7 to 713 GenBank Graphics Next Match Previous Match

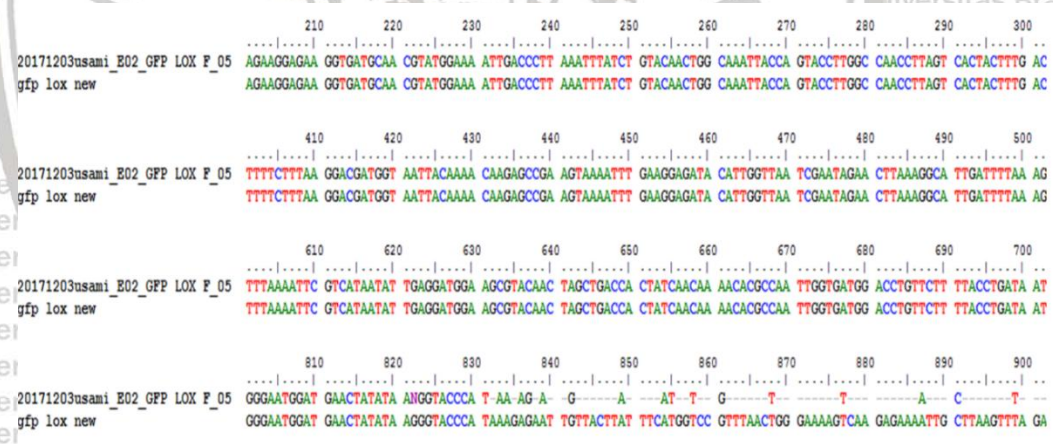
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
398 bits(215)	2e-106	544/708(77%)	2/708(0%)	Plus/Plus
Query 13	AAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGAGTAGTTCCTATATTAGTGGAACTTGGTGTGATGTT	72		
Sbjct 7	AAAGGCGAAAGACTGTTTACCGGCGTGGTCCGATCTGGTGGACGATGGCGATGTG	66		
Query 73	AATGGGCATAAATTTTCAGTGTCTGGAGAAGGAGAAGGTGATGCAACGTATGGAAAATTG	132		
Sbjct 67	AACGGCCAGAAATTTAGCGTGAGCGCCGAAGGCGAAGCGATGGCACTTGGCAAACTG	126		
Query 133	ACCTTAAAATTTATCTGTACAACCTGGCAAATTCAGTACCTTGGCCAACCTTAGTCACT	192		
Sbjct 127	ACCTGAAATTTATTTTGACACCAGCCGAAACTGCCGTCGCTGGCCGACCTGGTGACC	186		
Query 193	AC-TTGGACATAGTGGTTCAGTGTTCCTTTCAGTGTATCCAGACCATATGAAACAACGA	251		
Sbjct 187	ACCTTTGGC-TATGGCGTGCAGTGTCTTGGCGCTATCCCGATCATATGAAACGACATGA	245		
Query 252	TTTTCTTAAATCAGCCATGCCTGAAAGTTATGTACAAGAACGATTTTCTTTAAGGA	311		
Sbjct 246	TTTTTTTTAAAGCGGATGCCGGAAGGCTATGTGCAGGAACGCACATTTTTATAAGA	305		
Query 312	CGATGGTAATTACAAAACAAGAGCCGAAGTAAAAATTTGAAGGAGATACATTGGTTAATCG	371		
Sbjct 306	TGATGGCACTATAAAACCCGCGGAAAGTGAATTTGAAGGCGATACCCTGGTGAACCG	365		
Query 372	AATAGAACCTAAAGGCATTGATTTTAAAGAGATGGCAACATTTAGCCATAAATTTGGA	431		
Sbjct 366	CATTGAACCTGAAAGGCATTGATTTTAAAGAGATGGCAACATTTAGCCATAAATTTGGA	425		
Query 432	ATACAACATATAATCTCATAATGTTTATATTGGCAGACAACAAGAAGATGGGATCAA	491		
Sbjct 426	ATATAACTATAACAGCCATAAGCTGTATATTATGGCGGATAAACCGAAGGCGGACATTA	485		
Query 492	AGTGAACCTTAAAATTCGTCATAATATTGAGGATGGAGCGTACAACCTAGCTGACCACTA	551		
Sbjct 486	AGTGAACCTTAAAATTCGTCATAACATTAAGATGGAGCGTCACTGGCGGATCATTAA	545		
Query 552	TCAACAAAACCGCCAAATGGTGTGGACCTGTTCTTTTACCTGATTAATCACTATTTAAG	611		
Sbjct 546	TGAGCAGAAACACCCCGAATTTGGCGATGGCCGGTGTCTGCTGCGGATAACCAATTTATCG	605		
Query 612	CACCTCAAAGTCTTTAAGCAAAGATCCAAAGTGAAGAACCGGATCACATGGTGTATTAGA	671		
Sbjct 606	CACCCAGAGCGCGTGAAGCAAAGATCCGAACGAAAACCGGATCATATGATTCGCTGGA	665		
Query 672	GTTCTGTTACAGCTGAGGGATTACCTTGGGAATGGATGAACCTATATAA 719			
Sbjct 666	ATTTGTGACCGCGGGGCTATCCCATGGCATGGATGAACCTATATAA 713			

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

enhanced green fluorescent protein [synthetic construct]
Sequence ID: [ADQ48006.1](#) Length: 268 Number of Matches: 1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame																																			
460 bits(1184)	1e-162	Compositional matrix adjust.	238/238(100%)	238/238(100%)	0/238(0%)	+1																																			
Query 7	VSKGEELFTGVVPI	LVELDGDVNGHKF	SVS	GE	EGD	ATY	YGK	L	L	K	F	I	C	T	T	G	K	L	P	V	P	W	P	T	1																
Sbjct 2	VSKGEELFTGVVPI	LVELDGDVNGHKF	SVS	GE	EGD	ATY	YGK	L	L	K	F	I	C	T	T	G	K	L	P	V	P	W	P	T	61																
Query 187	VTTLTYGVCFSRYP	DHMKQHDFFK	SAM	PE	GY	Q	ERT	I	F	F	K	D	D	G	N	Y	K	T	R	A	E	V	K	F	E	G	D	T	L	366											
Sbjct 62	VTTLTYGVCFSRYP	DHMKQHDFFK	SAM	PE	GY	Q	ERT	I	F	F	K	D	D	G	N	Y	K	T	R	A	E	V	K	F	E	G	D	T	L	121											
Query 367	NRIELKGIDFKED	GNI	LGH	KL	E	Y	N	N	S	H	N	V	I	M	A	D	K	Q	K	N	G	I	K	V	N	F	K	I	R	H	N	I	E	D	G	S	V	L	A	D	546
Sbjct 122	NRIELKGIDFKED	GNI	LGH	KL	E	Y	N	N	S	H	N	V	I	M	A	D	K	Q	K	N	G	I	K	V	N	F	K	I	R	H	N	I	E	D	G	S	V	L	A	D	181
Query 547	HYQONTPIGDGP	VLLP	DNH	Y	L	S	T	S	A	L	S	K	D	P	N	E	K	R	D	H	M	L	L	E	F	V	T	A	A	G	I	L	G	M	D	E	L	Y	720		
Sbjct 182	HYQONTPIGDGP	VLLP	DNH	Y	L	S	T	S	A	L	S	K	D	P	N	E	K	R	D	H	M	L	L	E	F	V	T	A	A	G	I	L	G	M	D	E	L	Y	239		

Hasil pensejajaran sekuen GFP-LOX-1 menggunakan piranti lunak Bioedit



Sekuen pNZ8148 GFP- LOX-1 dengan primer pNZ8148 reverse

NNNNTNNAAANNNNNNCCCNTNNCCNGANNNNNTTATGTNNNAANNNGAANNNGATNTNTNT
 TNNGGNNGATGGGTAATTTACAAANCAAGAGCCGAAAGTAAAATTTGAAGGGAGATACAT
 TTGGTTAATCGAATAGAACTTAAAGGCATTGATTTTAAAGAAGATGGCAACATTTTAGGC
 CATAAATTGGAATACAACATAAATTCATATAATGTTTATATTATGGCAGACAAAACAAAAG
 AATGGGATCAAAGTGAACCTTTAAAAATTCGTCATAATATTGAGGATGGAAGCGTACAACATA
 GCTGACCACTATCAACAAAACACGCCAATTGGTGATGGACCTGTTCTTTTACCTGATAAT
 CACTATTTAAGCACTCAAAGTGCTTTAAGCAAAGATCCAAATGAGAAACGCGATCACATG
 GTGTTATTAGAGTTCGTTACAGCTGCAGGGATTACCTTGGGAATGGATGAACATATAAG
 GGTACCCATAAAGAGAATTGTTACTTATTTTCATGGTCCGTTTAACTGGGAAAAGTCAAGA
 GAAAATTGCTTAAGTTTAGATGCTCAACTTCTTCAAATCAGTACCCTGATGACTTAAAT
 TTTGTCTTACAAGCTACATCTCATTCAACATCACCGTTTTGGATGGGACTACATAGAAG
 AATCCCAATCATCCATGGTTATGGGAAAATGGATCTCCACTATCATTTCAGTTCTTTTCGT

ACTAGAGGAGTTTCATTGCAGATGTATTCATCTGGTACATGTGCGTATATAACAAGGAGGG
GTTGTCTTTGCAGAGAATTGCATTTTACTGCATTTTCAATTTGTCAGAAGAAAGCGAAT
CTTCTTTTAACACAATAAAAAGCTTCTTTGAACCAAATTAGAAAACCAAGGCTTGAAAC
GTTCAATTGAAATGGCAATTAACAAATTACAGCACGNNTNNNTTNNNTANNNNNANN

Hasi analisa sekuen dengan program I BLASTn

Synthetic construct hgfp gene for green florescent protein, complete cds
Sequence ID: [LC018335.1](#) Length: 717 Number of Matches: 1

Range 1: 329 to 713 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
243 bits(131)	9e-60	302/387(78%)	2/387(0%)	Plus/Plus
Query 33	CGAAAGTAAAATTTGAAGGGAGATACATTTGGTTAATCGAATAGAACTTAAAGGCATTGA			92
Sbjct 329	CGGAAGTGAAATTTGAAGG-CGATAC-CCTGGTGAACCGCATTGAACTGAAAGGCATTGA			386
Query 93	TTTTAAAGAAGATGGCAACATTTTAGGCCATAAATTTGGAATACAATAATTCTCATAA			152
Sbjct 387	TTTTAAAGAAGATGGCAACATTTCTGGGCCATAAATGGAATATAACTATAACAGCCATAA			446
Query 153	TGTTTTATATTATGGCAGACAAACAAAAGAATGGGATCAAAGTGAACCTTTAAAATTCGTCA			212
Sbjct 447	CGTGTATATTATGGCGGATAAACCGAAAAACGGCATTAAAGTGAACCTTTAAAATTCGCCA			506
Query 213	TAATATTGAGGATGGAAAGCGTACAACCTAGCTGACCCTATCAACAAAACACGCCAATTGG			272
Sbjct 507	TAACATTAAGATGGCAGCGTGCAGCTGGCGGATCATTTACAGCAGAACACCCCGATTGG			566
Query 273	TGATGGACCTGTTCTTTTACCTGATAATCACTATTTAAGCACTCAAAGTGCTTTAAGCAA			332
Sbjct 567	CGATGGCCCCGGTGTCTGTCGCCGATAACCATATCTGAGACCCAGAGCGCGCTGAGCAA			626
Query 333	AGATCCAATGAGAAACGCGATCACATGGTGTATTAGAGTTTCGTACAGCTGCAGGGAT			392
Sbjct 627	AGATCCGAAACGAAAAACGCGATCATATGATCTGCTGGAAATTTGTGACCGCGCGGGCAT			686
Query 393	TACCTTGGGAATGGATGAACATATAA 419			
Sbjct 687	TACCCATGGCATGGATGAACGTATAA 713			

Hasi analisa sekuen dengan program BLASTx

oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Rattus norvegicus]
Sequence ID: [NP_579840.2](#) Length: 368 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 246 to 363 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
264 bits(674)	1e-83	Compositional matrix adjust.	118/118(100%)	118/118(100%)	0/118(0%)	+1
Query 427	HKENCYLFHGPFFNWEKSRNCLSLDAQLLQISTDDLNFLVQATSHSTSPFWMLHRKNP					606
Sbjct 246	HKENCYLFHGPFFNWEKSRNCLSLDAQLLQISTDDLNFLVQATSHSTSPFWMLHRKNP					305
Query 607	NHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKAN					780
Sbjct 306	NHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKAN					363

enhanced green fluorescent protein [synthetic construct]

Sequence ID: [ADQ48006.1](#) Length: 268 Number of Matches: 1

Range 1: 107 to 239 [GenPept](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
255 bits(651)	1e-81	Compositional matrix adjust.	126/134(94%)	127/134(94%)	1/134(0%)	+1
Query 19	YKXRAESKI*REIHLVNR	IELKGI	DFKEDGNILGHKLE	YNYNSHVYIMADKQK	NGIKVN	198
Sbjct 107	YKRAEVKFE	GD + LVNRIELK	GI	DFKEDGNILGHKLE	YNYNSHVYIMADKQK	165
Query 199	FKIRHNIEDG	SVQLADHYOQNTPI	GDGPVLLPDNHYL	STQSALS	KDPNEKR	DHMLLEFV 378
Sbjct 166	FKIRHNIEDG	SVQLADHYOQNTPI	GDGPVLLPDNHYL	STQSALS	KDPNEKR	DHMLLEFV 225
Query 379	TAAGITLGM	DELYK				420
Sbjct 226	TAAGITLGM	DELYK				239

Sekuen pNZ8148 LOX-1 dengan primer pNZ8148 forward

```

CNNNNNNNNNNNNNNNCNCCNCTGGAAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCTGGC
TCTGGATCTGGTATCGAGGGAAGGCC TTATAATGGAAGTGGATCCGCATGCGAGCTCGGTAC
CCATAAAGAGAATTGTTACTTATTTTCATGGTCCGTTTAACTGGGAAAAGTCAAGAGAAAATT
GCTTAAGTTTAGATGCTCAACTTCTTCAAATCAGTCCACTGATGACTTAAATTTTGTCTTAC
AAGCTACATCTCATTCACATCACCGT TTTGGATGGGACTACATAGAAAGAACCCAATCATC
CATGGTTATGGGAAAATGGATCTCCACTATCATTTTCAGTTCTTTTCGTA TAGAGGAGTTTCA
TTGCAGATGTATTCATCTGGTACATGTGCGTATATACAAGGAGGGGTTGTCTTTGCAGAGAA
TTGCATTTTGACTGCATTTTCAATTTGTCAGAAGAAAGCGAATCTTCTTTTAAACACAATAAA
AGCTTCTTTTGAACCAAATTAGAAAACCAAGGCTTGAACGTTCAATTGAAATGGCAATTA
AACAAATTACAGCACGTGTTGCTTTGATTGATAGCCAAAAGCAGCAGTTGATAAAGCAATT
ACTGATATTGCTGAAAAATTGTAATTTATAAATAAAAATCACCTTTTAGAGGTGGTTTTTTTT
ATTTATAAATTATTCGTTTGTATTTGCTTTTCGATAGAACAAATCAAATCGTTTCTGAGACGTT
TTAGCGTTTATTTTCGTTTGTATTCGGCATAATCGTTAAAACAGGCGTTATCGTAGCGTAAA
AGCCCTTGAGCGTAGCGTGGNTTTGCAGCGAAGATGTTGTCTGTTAGATTATGAAAGCCCGA
aGNNNNNTNGNNNGGGGNNNANNNNNAA
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Rattus norvegicus oxidized low density lipoprotein receptor 1 (Olr1), mRNA

Sequence ID: [NM_133306.2](#) Length: 3751 Number of Matches: 1

Range 1: 815 to 1143 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
255 bits(282)	6e-64	258/331(78%)	6/331(1%)	Plus/Plus	
Query 2	CATAAAGAGA	AATTGTTACTT	ATTTTCATGGT	CCGTTTAACTGGG - -AAAAGTCAAGAGAAA 59	
Sbjct 815	CATAAAGAAA	ACTGTTACCT	TCCATGGGCC	CTTTAACTGGGAAAAAAGTC - -GGGAGA 872	
Query 60	ATTGCTTAAG	TTAGATGCTCA	ACTTCTTCAA	ATCAGT - CCACTGATGACTTAAATTTTG 118	
Sbjct 873	ATTGCTATCT	TAGATGCCAG	TACTACAAAT	TAGTACCACAGATGATCTGAACCTTCG 932	
Query 119	TCTTACAAG	CTACATCTCA	TTCACATCAC	CGTTTTGGATGGGACTACAT - AGAAAGAAC 177	
Sbjct 933	TCTTACAAGC	AACCTCCCAT	TCCACCTCC	CCCATTTTGGATGGGATACATCGGAAAAATC 992	
Query 178	CCAATCATC	ATGGTTATGG	GAATGGAT	TCCCATATCATTTTCAGTTCTTTTCGTA 237	
Sbjct 993	CCAAACCCCA	TGGCTATGG	GAGAACGGCT	CTCTTTGAGTTTTCAATCTTTTAGACCA 1052	
Query 238	GAGGAGTTT	CATTGCAGAT	GTATTCATCT	GGTACATGTCGTATATACAAGGAGGGGTTG 297	
Sbjct 1053	GGGGCGTTT	CTTACAGAT	TACTCATCAG	GCACCTGTGCATATTTACAAGGAGGAGTTG 1112	
Query 298	TCTTGCAGA	GAATTCATTT	GACTGCATT		328
Sbjct 1113	TGTTTGTG	TGAAAAC	TGCATTTAA	CTGCATT	1143

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Rattus norvegicus]

Sequence ID: [NP_579840.2](#) Length: 368 Number of Matches: 3

[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 303 to 368 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
	142 bits(358)	2e-59	Compositional matrix adjust.	65/66(98%)	65/66(98%)	0/66(0%)	+1
Query	295	KEPNHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKA				474	
Sbjct	303	KPNHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKA				362	
Query	475	NLLLTQ	492				
Sbjct	363	NLLLTQ	368				

Range 2: 246 to 277 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
	73.6 bits(179)	2e-59	Compositional matrix adjust.	32/32(100%)	32/32(100%)	0/32(0%)	+3
Query	126	HKENCYLFHGPFWWEKSRENCLSLDAQLLQIS	221				
Sbjct	246	HKENCYLFHGPFWWEKSRENCLSLDAQLLQIS	277				

Range 3: 278 to 305 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
	63.9 bits(154)	2e-59	Compositional matrix adjust.	27/28(96%)	28/28(100%)	0/28(0%)	+2
Query	221	STDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNP	304				
Sbjct	278	TTDDLNFVLQATSHSTSPFWMGLHRKNP	305				

Hasil pensejajaran sekuen GFP-LOX-1 menggunakan piranti lunak Bioedit

```

110      120      130      140      150      160      170
20171203usami_A02_LOX_F_01  TGGATCCGCATGCGAGCTCGGTACCCATAAAGAGAATTGTTACTTATTTTCATGGTCCGTTTAACTGGG--AAAA
lox                               aaaaagaaaactgttacctctccatgggcccctttaactgggaaaaaa

210      220      230      240      250      260      270
20171203usami_A02_LOX_F_01  ATGCTCAACTTCTTCAAATCAGTACCACTGATGACTTAAATTTTGTCTTACAAGCTACATCTCATTCAACATCA
lox  atgcccagttactacaaattagtaccacagatgatctgaactctgcttacaagcaactcccattccaacctcc

310      320      330      340      350      360      370
20171203usami_A02_LOX_F_01  GAATCCCAATCATCCATGGTTATGGGAAATGGATCTCCACTATCATTTTTCAGTTCTTTTCTACTAGAGGAGTTT
lox  aaatcccaccccccattggctatggg--a-g-----a-a-----cgg-----c-t-c-----t
    
```

Sekuen pNZ8148 LOX-1 dengan primer pNZ8148 reverse

```

NNNNNNNNNNNNNNNCNNNNCAACNCGTGCTGTAATTTGTTTAATTGCCATTTCAATTGAAC
GTTTCAAGCCTTGGTTTTCTAATTTGGTTCAAAGAAAGCTTTTATTGTGTTAAAAGAAGAT
TCGCTTTCTTCTGACAAATTGAAAAATGCAGTCAAAATGCAATTCTCTGCAAAGACAACCCCC
CTTGTATATACGCACATGTACCAGATGAATACATCTGCAATGAAACTCCTCTAGTACGAAAG
AACTGAAATGATAGTGGAGATCCATTTTCCCATAACCATGGATGATTGGGATCTTTCTATGT
AGTCCCATCCAAAACGGTGATGTTGAATGAGATGTAGCTTGTAAAGACAAAATTTAAGTCATC
AGTGGTACTGATTTGAAGAAGTTGAGCATCTAAACTTAAGCAATTTTCTCTTGACTTTTCCC
AGTTAAACGGACCATGAAATAAGTAACAATTCTCTTTATGGGTACCGAGCTCGCATGCGGAT
CCAGTTCATTATAAGGCCTTCCCTCGATACCAGATCCAGAGCCAGATCCGTGATGGTGATG
GTGATGCGATCCTCTTTCCATGGCAGCGTAAACACCTGACAACGGGGCTGCAGCAGAAAGTA
TCACTGTAGACATTAATAAGCTGAGATAATCTTTTTTTTTCATGGTGAGTGCCTCCTTATAA
TTTATTTTGTAGTTCCTTTCGAACGAAATCATTGTATCTAACAAACTTCAGAATTTAATCAGA
GCCGTTTATTATGCTCGCGTTATCGACAATAATATTATTACCAATACTTTCTCAAGATAGAA
TTAAGACTGTTTTAGATTTGTTAATGTTTCTATTGTCAGTATAGTTATAAGACAGATCTGGA
GCTGTAATATNAAAAANCCTTCTTCANNTNANNNGNNNNNTNANNNACATTANAAAAAACCC
NAACNNNNNAAAAANNNGN
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Rattus norvegicus oxidized low density lipoprotein receptor 1 (Olr1), mRNA
 Sequence ID: [NM_133306.2](#) Length: 3751 Number of Matches: 1

Range 1: 815 to 1164 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
271 bits(300)	2e-68	274/352(78%)	6/352(1%)	Plus/Minus
Query 3	GCTTCTCTGACAAATGAAAAATGCAGTCAAAATGCAATTCTCTGCAAAGACAACCC-	61		
Sbjct 1164	GCCTTCTTCTGACATATGCTGAATGCAAGTAAAATGCAAGTTTTCAGCAAACACAACTCCT	1105		
Query 62	CCTTGTATATACGCACATGTACCAGATGAATACATCTGCAATGAAACTCCTCTAGTACGA	121		
Sbjct 1104	CCTTGAATATATGCACAGGTGCCTGATGAGTACATCTGTAAGAAACGCCCTGGTCTTA	1045		
Query 122	AAGAACTGAAATGATAGTGGAGATCCATTTTCCCATAACCATGGATGATTGGGATCTTTC	181		
Sbjct 1044	AAGAATTGAAAACCAAAGGAGAGCCGTTCTCCCATAGCCATGGGTGGTGGGATTTTTC	985		
Query 182	T-ATGTAGTCCCATCCAAAACGGTGATGTTGAATGAGATGTAGCTTGTAAAGCAAAATTT	240		
Sbjct 984	CGATGTAATCCCATCCAAAATGGGGAGGTGGAATGGGAAGTTGCTTGTAAAGCGAAGTTC	925		
Query 241	AAGTCATCAGTGGTACTGATTTGAAGAAGTTGAGCATCTAAACTTAAGCAATTTTCTCTT	300		
Sbjct 924	AGATCATCTGTGGTACTAATTTGTAGTAACTGGGCATCTAAAGATAGGCAATTTCTCCC--	867		
Query 301	GACTTTT--CCCAGTTAAACGGACCATGAAATAAGTAACAATTTCTTTTATG	350		
Sbjct 866	GACTTTTTTCCCAGTTAAAGGGCCCATGGAAGAGGTAACAGTTTCTTTTATG	815		

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

oxidized low-density lipoprotein receptor 1 [Rattus norvegicus]

Sequence ID: [NP_579840.2](#) Length: 368 Number of Matches: 3

[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 246 to 305 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
133 bits(335)	5e-50	Compositional matrix adjust.	59/60(98%)	59/60(98%)	0/60(0%)	-1

Query	397	HKENCYLFHGPFMIEKSRENCLSLDAQLLOISTTDDLNFVLOATSHSTSPFWMGLHRKIP	218
		HKENCYLFHGPFMIEKSRENCLSLDAQLLOISTTDDLNFVLOATSHSTSPFWMGLHRK P	
Sbjct	246	HKENCYLFHGPFMIEKSRENCLSLDAQLLOISTTDDLNFVLOATSHSTSPFWMGLHRKNP	305

Range 2: 303 to 361 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
94.0 bits(232)	5e-50	Compositional matrix adjust.	42/59(71%)	46/59(77%)	0/59(0%)	-3

Query	227	KDPNHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGLSLQRIAF*LHFQFVRRK	51
		K+PNHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGG+ F ++K	
Sbjct	303	KNPNIHPWLWENGSPLSFQFFRTRGVSLQMYSSGTCAYIQGGVFAENCILTAFSICQKK	361

Range 3: 337 to 368 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
57.4 bits(137)	1e-05	Compositional matrix adjust.	28/32(88%)	29/32(90%)	1/32(3%)	-2

Query	123	CVYTRG-VFAENCILTAFSICQKKANLLLTQ	31
		C Y +G VFAENCILTAFSICQKKANLLLTQ	
Sbjct	337	CAYIQGGVFAENCILTAFSICQKKANLLLTQ	368

Sekuen pcNZ8148 GFP dengan primer pNZ8148 forward

```

CNNNNNTNNNGNNTNNNNNTNNCNNGGNAAGAGGATCGCATCACCATCACCAATCACGGA
TCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAGGGNAGGCCTTATAATGGAACCTGGATCCGTTTCAAAGG
TGAAGAATTATTCACCTGGAGTAGTTCCTATATTAGTGAACCTTGATGGTGATGTTAATGGGC
ATAAAATTTTCAGTGTCTGGAGAAGGAGAAGGTGATGCAACGTATGGAAAATTGACCCTTAAA
TTTATCTGTACAACCTGGCAAATTACCAGTACCTTGGCCAACCTTAGTCACTACTTTGACATA
TGGTGTTTCAGTGTTTTAGTCGTTATCCAGACCATATGAAACAACACGATTTCTTTAAATCAG
CCATGCCTGAAGGTTATGTACAAGAACGAACGATTTTCTTTAAGGACGATGGTAATTACAAA
ACAAGAGCCGAAGTAAAATTTGAAGGAGATACATTTGGTTAATCGAATAGAACTTAAAGGCAT
TGATTTTAAAGAAGATGGCAACATTTTAGGCCATAAATTGGAATACAACCTATAATTCTCATA
ATGTTTATATTATGGCAGACAAAAGAAATGGGATCAAAGTGAACCTTAAAATTCGTCAT
AATATTGAGGATGGAAGCGTACAACCTAGCTGACCACATCAACAAAACACGCCAATTGGTGAA
TGGACCTGTTCTTTTACCTGATAATCACTATTTAAGCACTCAAAGTGCTTTAAGCAAAGATC
CNAATGAGAAACGCGATCACATGGTGTATTAGAGTTCGTTACAGCTGCAGGGATTACCTTG
GGGAATGGATGAACTATATANGGGTACCCCGGGGTCGACCCTGCAGCCAAAGCTTAAATTAG
CTGANCTTTGGGACTCCCTNNCTAGAGAGNCAAGCTTTTTCNNNNAANNNAATTNAAAAA
CCAANGGNNNNNNAAAACCNNNNNNTNCNNNN
    
```

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Synthetic construct hgfp gene for green fluorescent protein, complete cds

Sequence ID: [LC018335.1](#) Length: 717 Number of Matches: 1

Range 1: 13 to 654 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
385 bits(208)	1e-102	498/643(77%)	2/643(0%)	Plus/Plu
Query 2	GAAGAATTATTCACTGGAGTAGTCCATATTAGTGGAACTGATGGTGATGTTAATGGG	61		
Sbjct 13	GAAGAACGTGTTACCGCGTGGTCCGATTCTGGTGGAACTGGATGGCGATGTGAACGGC	72		
Query 62	CATAAATTTTCAGTGTCTGGAGAAGGAGAAGGTGATGCAACGTATGGAAATTTGACCCCTT	121		
Sbjct 73	CAGAAATTTAGCGTGAGCGCGGAAAGGCGAAGGCGATGCGACCTATGGCAAATGACCCCTG	132		
Query 122	AAATTTATCTGTACAACATGGCAAATACCAGTACCTTGGCCAACTTAGTCACTAC - TTT	180		
Sbjct 133	AAATTTATTTGACCACCGCGCAAATGCGGGTGGCGGGCGACCTGGTGACCACCTTT	192		
Query 181	GACATATGGTGTTCAGTGTTTATGTCGTTATCCAGACCATATGAAACAACACGATTTCTT	240		
Sbjct 193	GGC - TATGGCGTGCAGTGCTTTGCGCGCTATCCGGATCATATGAAACAGCATGATTTTT	251		
Query 241	TAAATCAGCCATGCCTGAAGGTTATGTACAAGAACGAACGATTTTCTTTAAGGACGATGG	300		
Sbjct 252	TAAAAGCGCGATGCCGGAAGGCTATGTGCAAGAACGACCACTTTTTATAAAGATGATGG	311		
Query 301	TAATTACAAAAAAGAGCCGAAGTAAAATTTGAAGGAGATACATTGGTTAATCGAATAGA	360		
Sbjct 312	CAACTATAAAAACCGCGGAAAGTAAAATTTGAAGGAGATACCTGGTGAACCGCATTGA	371		
Query 361	ACTTAAAGGCATTGATTTTAAAGAAGATGGCAACATTTTAGGCCATAAATGGAAATACAA	420		
Sbjct 372	ACTGAAAGGCATTGATTTTAAAGAAGATGGCAACATTTTAGGCCATAAATGGAAATATAA	431		
Query 421	CTATAATCTCATAATGTTTATATTATGGCAGACAAACAAAGAATGGGATCAAAGTGAA	480		
Sbjct 432	CTATAACAGCCATAACGTGTATATTATGGCGGATAAACCGAAACCGCATTAAAGTGAA	491		
Query 481	CTTTAAAATTCGTATAATATTGAGGATGGAAGCGTACAACCTAGCTGACCACATCAACA	540		
Sbjct 492	CTTTAAAATTCGCCATAACATAAAGATGGCAGCGTGCAGCTGGCGGATCATTATCAGCA	551		
Query 541	AAACACGCCAATGGTGATGGACCTGTTCTTTACCTGATAACTACTATTTAAGCACTCA	600		
Sbjct 552	GAAACACCCGATTGGCGATGGCCCGGTGCTGCTGCCGATAAACCATTATCTGAGCACCA	611		
Query 601	AAGTGCTTTAAGCAAAGATCCNAATGAGAAACGCGATCACATG 643			
Sbjct 612	GAGCGGCTGAGCAAAGATCCGAAACGAAACGCGATCATAATG 654			

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

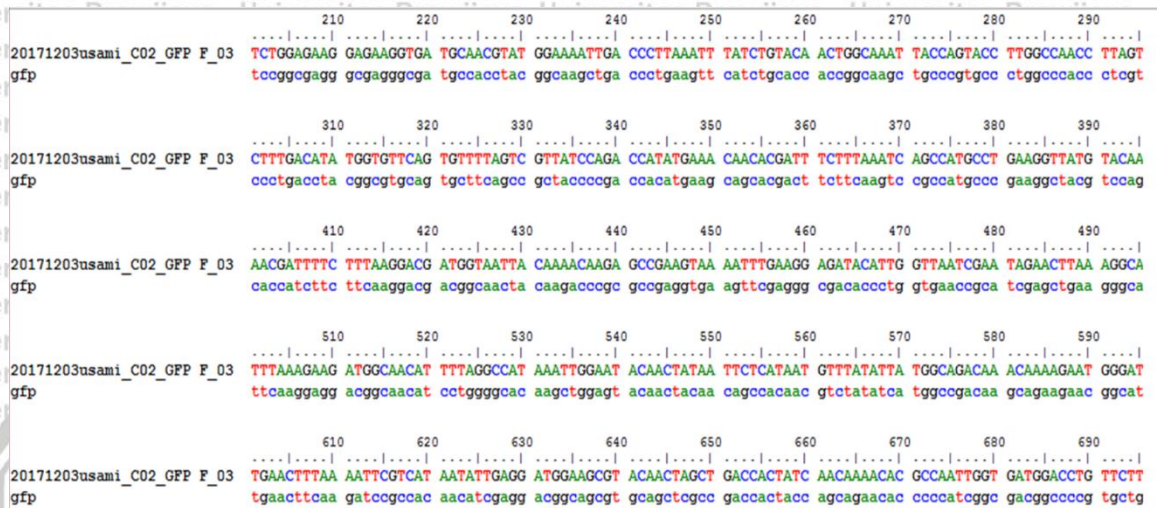
enhanced green fluorescent protein [synthetic construct]

Sequence ID: [ADQ48006.1](#) Length: 268 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 232 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
441 bits(1133)	2e-155	Compositional matrix adjust.	227/227(100%)	227/227(100%)	0/227(0%)	+2
Query 2	EELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTGKLFICTTGKLPVDPWPTLVTT1	181				
Sbjct 6	EELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTGKLFICTTGKLPVDPWPTLVTTL	65				
Query 182	TYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDGLVNRIE	361				
Sbjct 66	TYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDGLVNRIE	125				
Query 362	LKGIDFKEDGNIILGHKLEYNYNSHNVYIADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQVLADHYQO	541				
Sbjct 126	LKGIDFKEDGNIILGHKLEYNYNSHNVYIADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQVLADHYQO	185				
Query 542	NTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMMLLEFVTAAGITL 682					
Sbjct 186	NTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMMLLEFVTAAGITL 232					

Hasil pensejajaran sekuen GFP-LOX-1 menggunakan piranti lunak Bioedit



Sekuen pcNZ8148 GFP dengan primer pNZ8148 reverse

CNNNNTTCNNNNGGANNTCTGGNCTNNNNGNNTCTGGGTNTNGAGGAAAGNNNNTTATAN
 NNAANCTGGGATNCCGTTTCAAAAAGGTGAAGAANTNNTTCACTGGAGTAGTTCCTATA
 TTAGTGGAACTTGATGGTGATGTTAATGGGCATAAATTTTCAGTGTCTGGAGAAGGAGAA
 GGTGATGCAACGTATGAAAATTGACCCTTAAATTTATCTGTACAACCTGGCAAATTACCA
 GTACCTTGCCAACCTTAGTCACTACTTTGACATATGGTGTTTTCAGTGTTTTAGTCGTTAT
 CCAGACCATATGAAACAACACGATTTCTTTAAATCAGCCATGCCTGAAGGTTATGTACAA
 GAACGAACGATTTTCTTTAAGGACGATGGTAATTACAAAACAAGAGCCGAAGTAAAATTT
 GAAGGAGATACATTGGTTAATCGAATAGAACTTAAAGGCATTGATTTTAAAGAAGATGGC
 AACATTTTAGGCCATAAATTGGAATACAACATAAATTTCTCATAATGTTTATATTATGGCA
 GACAAACAAAAGAATGGGATCAAAGTGAACCTTTAAAATTCGTCATAATATTGAGGATGGA
 AGCGTACAACCTAGCTGACCACTATCAACAAAACACGCCAATTGGTGATGGACCTGTTCTT
 TTACCTGATAATCACTATTTAAGCACTCAAAGTGCTTTAAGCAAAGATCCAAATGAGAAA
 CGCGATCACATGGTGTATTAGAGTTCGTTACAGCTGCAGGGATTACCTTGGGAATGGAT
 GAACATATAAAGGTACCCCGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGAC
 TCCTGTCTAGAGAGCTCAAGCTTTCTTTGAACCNTNATTAGAAAACCAAGGCTTGAACG
 TTCAATTGAAATGGCAATTAACAAAATTACAGCACGTGTTGCNNNGNNNNNNNNNNNN

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTn

Synthetic construct hgfp gene for green fluorescent protein, complete cds
 Sequence ID: [LC018335.1](#) Length: 717 Number of Matches: 1

Range 1: 46 to 713 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
392 bits(212)	8e-105	517/669(77%)	2/669(0%)	Plus/Plus
Query 4	GTGGAACTTGATGGT	GATGTTAATGGGCATAAAATTTTCAGTGTCTGGAGAAGGAGAAAGGT	63	
Sbjct 46	GTGGAACTGGATGGCGAT	GTGAACGGCCAGAAATTTAGCGTGAGCGCGCAAGGCGAAGGC	105	
Query 64	GATGCAACGTATGGAAAAT	TGACCCTTAAATTTACTGTACAACCTGGCAAAATACCAAGTA	123	
Sbjct 106	GATGCGACCTATGGCAAACT	GACCCTGAAATTTATTTGACCAACCAGGCAAACTGCGCGGTG	165	
Query 124	CCTTGGCCAACTTAGTCACTAC	-TTTGACATATGGGTTCAGTGTGTTTAGGTGTTATCC	182	
Sbjct 166	CCGTGGCCGACCTGGTGACCACCTTTGGC	-TATGGCGTGCAGTGTCTTGGCCGCTATCC	224	
Query 183	AGACCATATGAAACAACACAG	GATTTCTTAAATCAGCCATGCTGAAAGGTTATGTACAAGA	242	
Sbjct 225	GGATCATATGAAACAGCATG	ATTTTTTAAAGCCGCGATGCCGGAAGGCTATGTGCAGGA	284	
Query 243	ACGAACGATTTTTCTTTAAGGAC	CGATGGTAATACAAAAAAGAGCCGAAGTAAAAATTTGA	302	
Sbjct 285	ACGCACCATTTTTTATAAAGAT	GTGGCAACTATAAAACCCGCGGGAAGTGAATTTGA	344	
Query 303	AGGAGATACATTGGTAAATCGAAT	AGAAGCTTAAAGGCATGATTTAAAGAAAGATGGCAA	362	
Sbjct 345	AGCGGATACCTCGTGAACCGCAT	TGAACTGAAAGGCATGATTTAAAGAAAGATGGCAA	404	
Query 363	CATTTTAGGCCATAAATGGAA	TACAACATAAATCTCATAATGTTATATATGGCAGA	422	
Sbjct 405	CATTCTGGGCATAAAATGGAA	TATAACTATAACAGCCATAACGTGATATATGGCGGA	464	
Query 423	CAAAACAAAAGATGGGATCAA	AGTGAACCTTAAATTCGTCATAATATGAGGATGGAA	482	
Sbjct 465	TAAACCGAAAAACGGCATTAA	AGTGAACCTTAAATTCGCCATAACATTAAGATGGCAG	524	
Query 483	CGTACAACAGCTGACCACTAT	CAACAAAAACCGCAATGGTGATGGACCTGTTCTTTT	542	
Sbjct 525	CGTCAAGCTGGCGGATCATTAT	CAGCAGAAACCCCGATGGCGATGGCCGCGTCTGT	584	
Query 543	ACCTGATAATCACTATTTAAG	CACCTAAAGTGCTTTAAGCAAGATCCAAATGAGAAACG	602	
Sbjct 585	CCCGGATAACCATATCTGAG	CACCCAGAGCCGCTGAGCAAAAGATCCGAACGAAACACG	644	
Query 603	CGATCACATGGTGTATTAGAG	TTCGTACAGCTGCAGGGATTACCTGGGGAATGGATGA	662	
Sbjct 645	CGATCATATGATTCTGCTGGA	ATTTGTGACCGCGCGGCAATACCCATGGCATGGATGA	704	
Query 663	ACTATATAA	671		
Sbjct 705	ACTGTATAA	713		

Hasil analisa sekuen dengan program BLASTx

enhanced green fluorescent protein [synthetic construct]
 Sequence ID: [ADQ48006.1](#) Length: 268 Number of Matches: 1

Range 1: 16 to 239 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
435 bits(1119)	4e-153	Compositional matrix adjust.	224/224(100%)	224/224(100%)	0/224(0%)	+1
Query 1	LVELDGVNNGHKFSVSGEGEDAT	YGKLTLLKFICTTGKLVDPWPTLVTTLYGVQCF	180			
Sbjct 16	LVELDGVNNGHKFSVSGEGEDAT	YGKLTLLKFICTTGKLVDPWPTLVTTLYGVQCF	75			
Query 181	PDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT	IFFKDDGNYKTRAEVKFEGDNLVNR	360			
Sbjct 76	PDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT	IFFKDDGNYKTRAEVKFEGDNLVNR	135			
Query 361	NILGHKLEYNYNSHWYIMADKQ	KNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONTPI	540			
Sbjct 136	NILGHKLEYNYNSHWYIMADKQ	KNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONTPI	195			
Query 541	LPDNHYLSTQSALSKDPNEKR	DHMLLEFVTAAGITLGNDELK	672			
Sbjct 196	LPDNHYLSTQSALSKDPNEKR	DHMLLEFVTAAGITLGNDELK	239			

Lampiran 11

Hasil Uji Beda Data Kadar IgG Serum Anti-LOX-1 pada hari ke-35 setelah vaksinasi pertama

Group Statistics

Kelompok Penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IgG LOX-1 GFP	8	.25187	.108012	.038188
GFP	8	.15813	.031719	.011215

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower
IgG	Equal variances assumed	5.575	.033	2.355	14	.034	.093750	.039801	.008386	.179114
	Equal variances not assumed			2.355	8.198	.046	.093750	.039801	.002354	.185146

SAVE OUTFILE='C:\Users\valent\Documents\my document\S3\hasil\shinshu\SHR-SP\Ig m
inggu ke7.sav'

/COMPRESSED.

T-TEST

GROUPS = Kelompok(1,2)

/MISSING = ANALYSIS

/VARIABLES = SBP

/CRITERIA = CI(.95)

Lampiran 12

Hasil Uji Beda Data Kadar IgG Serum Anti-LOX-1 pada hari ke-56 setelah vaksinasi pertama

Group Statistics

	Kelompok Penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IgG	LOX-1 GFP	9	.20544	.147908	.049303
	GFP	9	.08352	.014762	.004921

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower
IgG	Equal variances assumed	11.138	.004	2.461	16	.026	.121928	.049548	.016892	.226964
	Equal variances not assumed			2.461	8.159	.039	.121928	.049548	.008058	.235797

DATASET ACTIVATE DataSet2.

DATASET CLOSE DataSet1.

T-TEST

GROUPS = Kelompok(1 2)

/MISSING = ANALYSIS

/VARIABLES = IgG

/CRITERIA = CI(.95)

Lampiran 13

Deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-1



Deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-2





Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-3



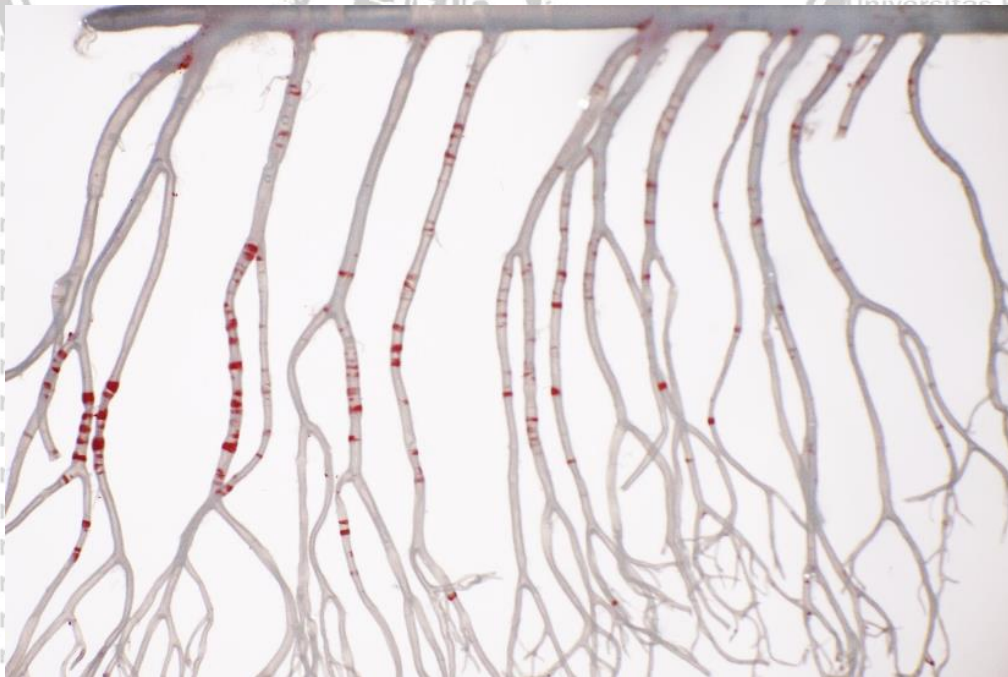
Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-4



Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-5



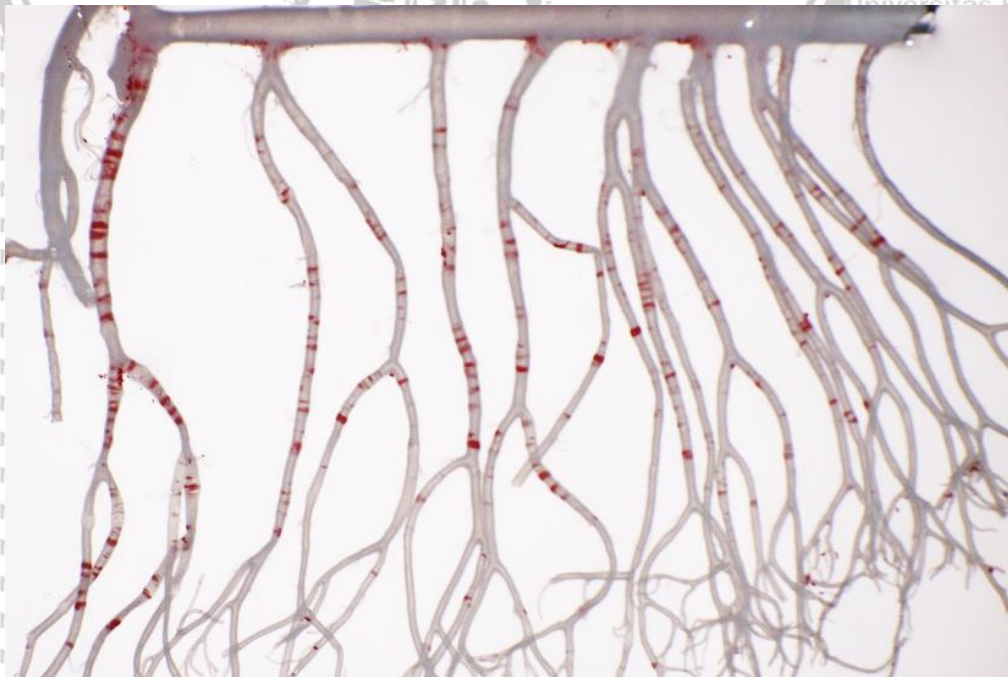
Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-6



Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-7



Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-8



Deposisi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok perlakuan GFP-LOX-1-9

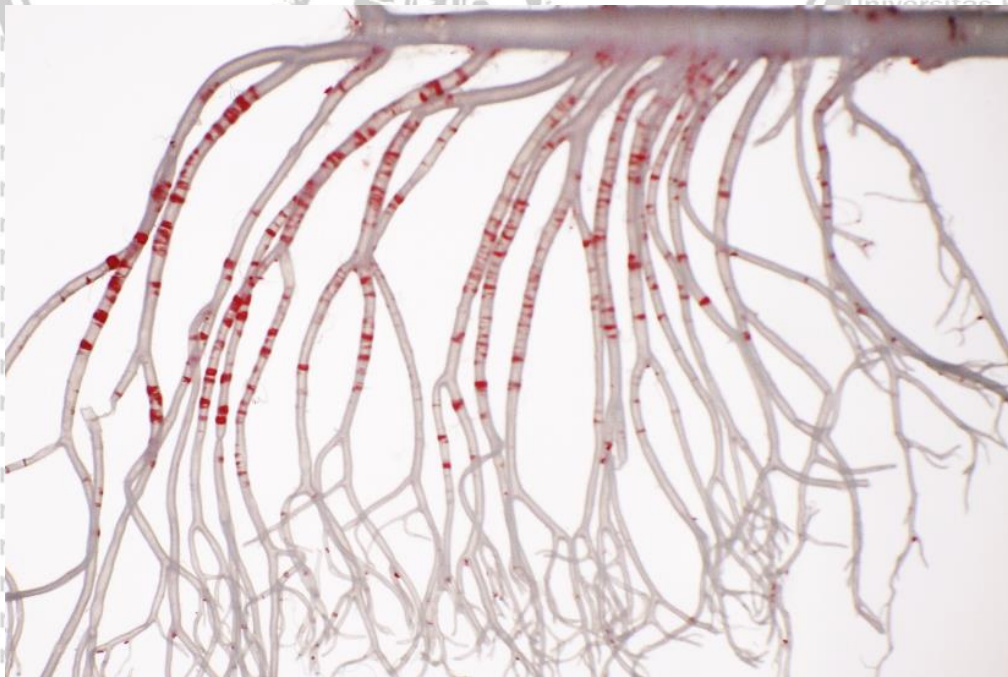




Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-1

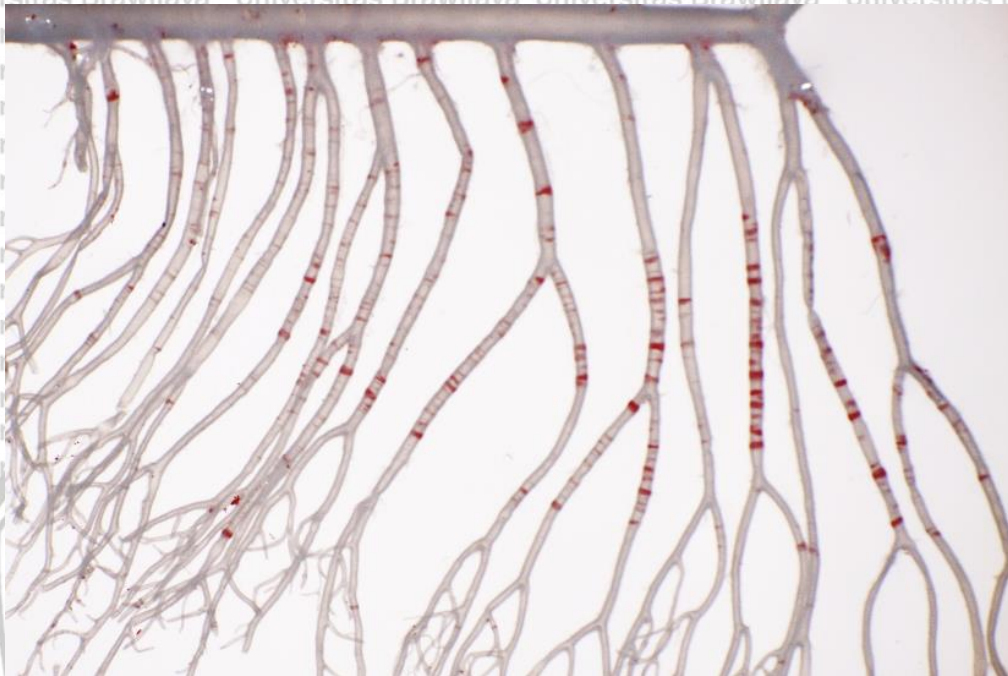


Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-2

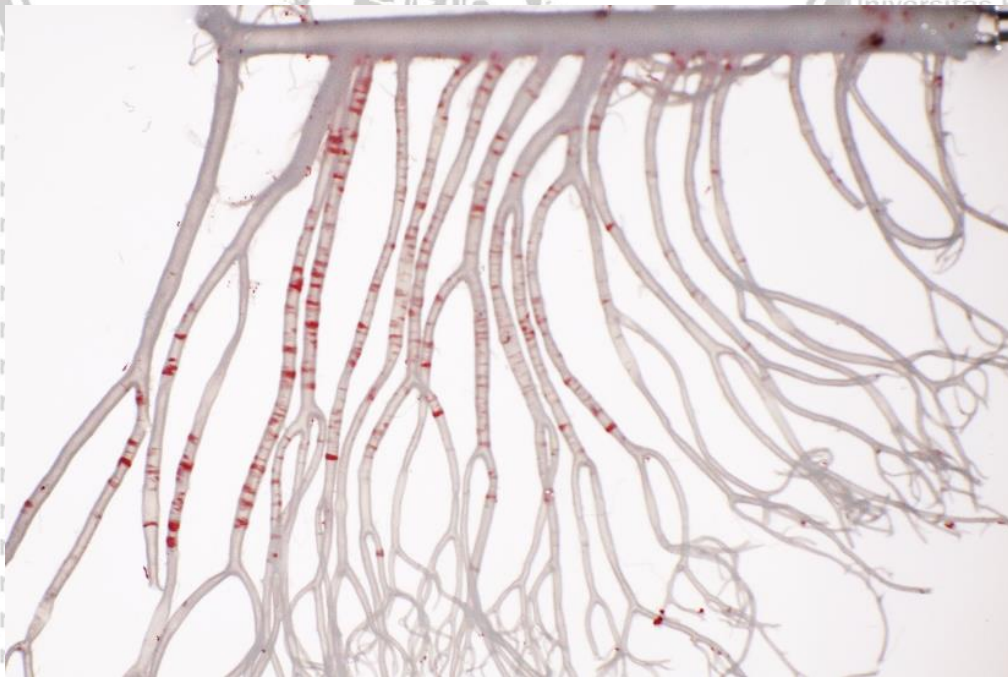




Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-3

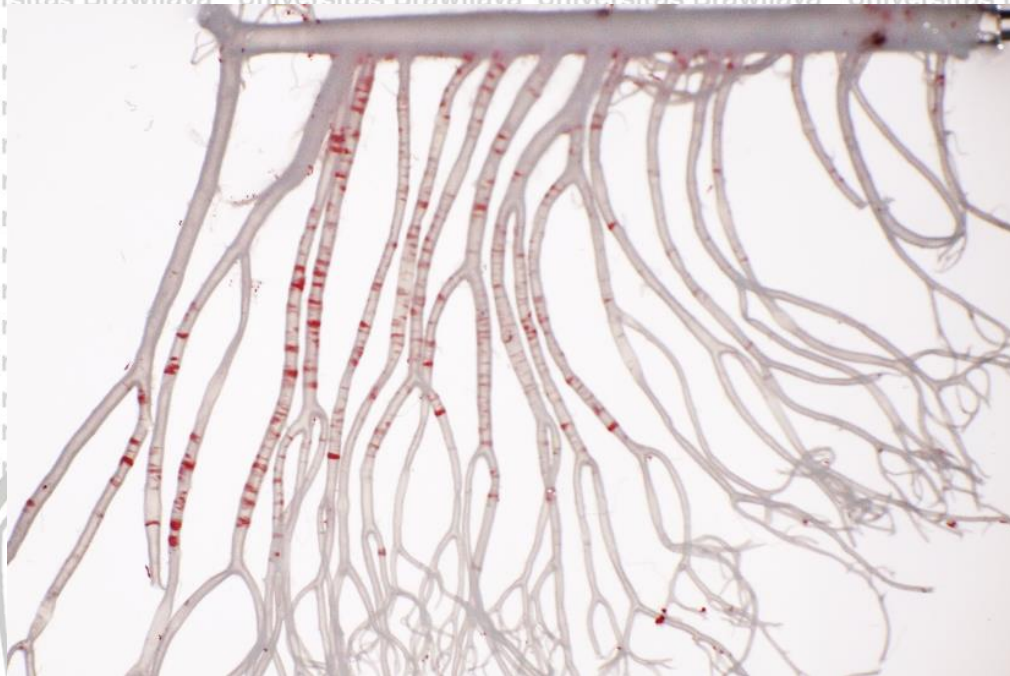


Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-4





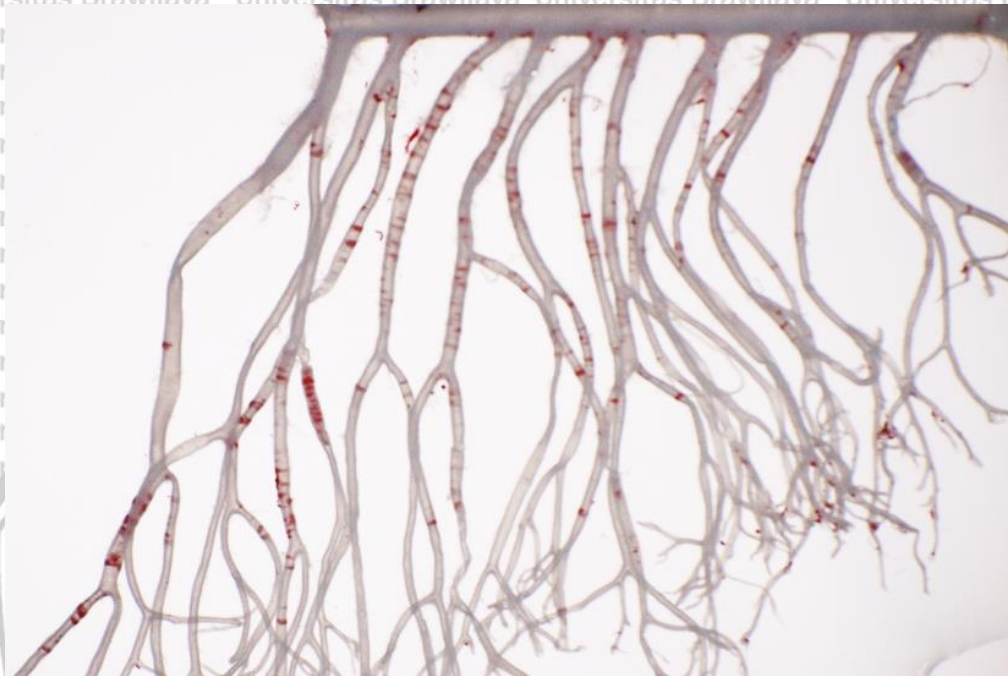
Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-5



Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-6



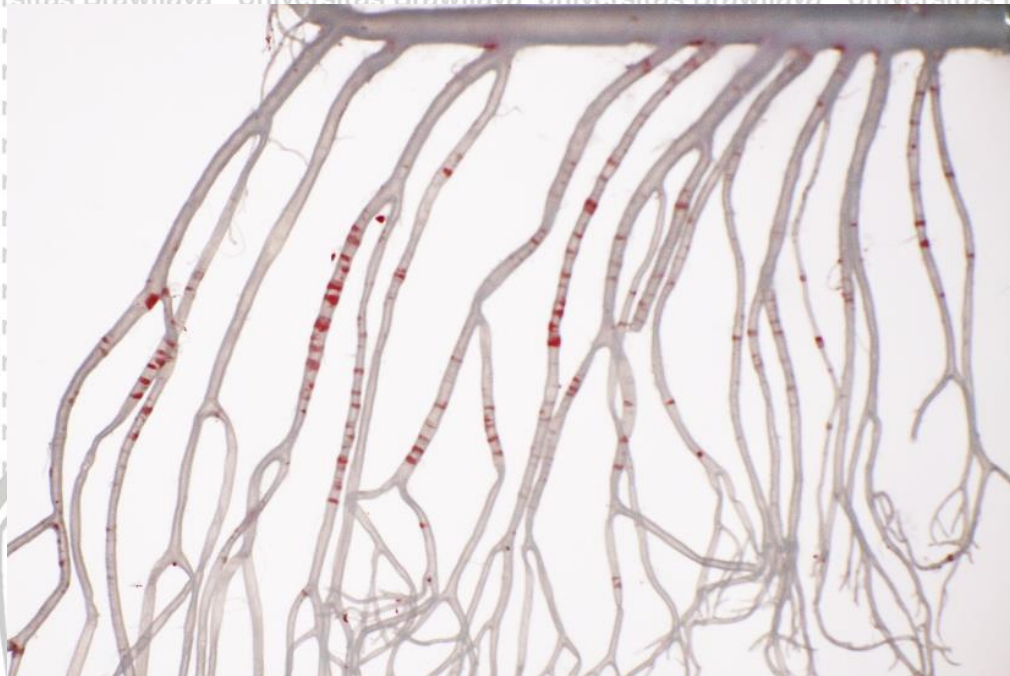
Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-7



Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-8



Depositi lipid pada *abdominal mesenteric artery* tikus kelompok kontrol GFP-9



Lampiran 14

Hasil Uji Beda Data Jumlah Area Deposisi Lipid

Group Statistics

	Kelompok Penelitian	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Deposisi Lipid	LOX-1 GFP	8	238.12500	42.269332	14.944466
	GFP	8	284.25000	95.457919	33.749471

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower
Deposisi Lipid	Equal variances assumed	2.807	.116	-1.250	14	.232	-46.125000	36.910213	-125.289534	33.039534
	Equal variances not assumed			-1.250	9.643	.241	-46.125000	36.910213	-128.780117	36.530117